

UNTERSUCHUNGEN
ZUR CHLOROPHYLL - BIOSYNTHESE
SOLUBILISIERUNG
UND EIGENSCHAFTEN
DER CHLOROPHYLL - SYNTHETASE

Marianne Blank-Huber

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHLOROPHYLL - BIOSYNTHESE
SOLUBILISIERUNG UND EIGENSCHAFTEN
DER CHLOROPHYLL - SYNTHETASE

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Marianne Blank-Huber
aus München

März 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Mai 1986

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger danke ich sehr herzlich für die Betreuung und Förderung dieser Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch

Herrn Dr. Soll für den Informationsaustausch während dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. J. Feierabend und seinen Mitarbeitern für die hilfsbereite Unterweisung in der Anzucht der ribosomen-defizienten Pflanzen,

Herrn Dr. habil. C. Lütz für die Zurverfügungstellung der Standortphotos der Hochgebirgspflanzen,

allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für ihre freundliche Unterstützung.

Abkürzungen:

GG	Geranylgeraniol
DHGG	Dihydrogeranylgeraniol
THGG	Tetrahydrogeranylgeraniol
P	Phytol
GGMP	Geranylgeraniolmonophosphat
GGFP	Geranylgeraniolpyrophosphat
PPP	Phytylpyrophosphat
IPP	Isopentenylpyrophosphat
FPP	Farnesylpyrophosphat
Chlid	Chlorophyllid
Chl	Chlorophyll
Chlase	Chlorophyllase
PChlid	Protochlorophyllid
PChl	Protochlorophyll
Phe	Pheophytin
Pheid	Pheophorbid
TCA	Trichloressigsäure
Glc-6-P-DHG	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
KPP	Kaliumphosphatpuffer
MOPS	3- N-Morpholino propansulfonsäure
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin
EA	Enzymaktivität
P-6DG	Polyacrylamid-Desalting-Gel
5-Ala	5-Aminolaevulinsäure
BSA	Rinderserumalbumin
NADPH	Nicotinamiddinucleotidphosphat, reduzierte Form
g FG	Gramm Frischgewicht
ÜUZ	Überstand der Ultrazentrifugation
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
LDAO	Lauryldimethylamin-N-Oxid
CHAPS	3- (3-cholamidopropyl)dimethyl- ammonio -1-propanesulfonate) x 2 H ₂ O
DEAE	Diethylaminoethyl
KD	Kilodalton
SDS	Sodiumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite:
A. EINLEITUNG	1
1. Die Protochlorophyllidreduktase	1
2. Die Chlorophyllsynthetase	3
3. Problem- und Aufgabenstellung	7
B. MATERIAL UND METHODEN	
1. Allgemein	8
1. Anzucht des Pflanzenmaterials	8
2. Ernte	8
3. Bereitung der Etioplastensuspension	8
3.1 Isolationsmedium	8
3.2 Resuspensionspuffer	8
3.3 Aufarbeitung	9
4. Vorbereitung der Etioplastensuspension	9
5. Ultraschallbehandlung	9
6. Substrate für den Enzymtest	10
6.1 Herstellung des Chlorophyllids	10
6.1.1 Chemikalien, Lösungsmittel	10
6.1.2 Durchführung	10
6.2 GGPP, PPP, IPP, FPP	11
6.3 NADPH	11
7. Enzymtest	11
7.1 Cofaktoren und Substratzugabe	11
7.2 Inkubation	12
7.3 Abstoppen der Reaktion	12
7.4 Überführung der Pigmente in Ether	12
7.4.1 Behandlung der Proben, die über HPLC weiter aufgetrennt werden	12
7.5 Abtrennung des veresterten Pigmentes	13
7.6 Quantitative Pigmentbestimmung	13
8. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	13
8.1 Vorzubereitende Lösungen	13

II

8.2	Gießen des Gels	14
8.3	Laufpuffer	15
8.4	Probenpuffer	15
8.5	Probenvorbereitung	16
8.6	Lauf	16
8.7	Färben des Gels	16
8.8	Entfärben des Gels	16
8.9	Eichproteine	16
9.	Proteinbestimmung nach Lowry	17

II. Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase

1.	Solubilisierung mit 50 % Glycerin	18
2.	Solubilisierung mit LDAD	18
3.	Solubilisierung mit Triton X 100	18
4.	Solubilisierung mit n-Octyl-Glucosid	19
5.	Solubilisierung mit Sulfobetain SB 12; SB 14	19
6.	Solubilisierung mit Digitonin	19
7.	Solubilisierung mit CHAPS	19
8.	Solubilisierung mit Brij 30, 56, 58, W1	19
9.	Schutzsubstanzen	19
10.	Standardsolubilisierungsmethode für die weitere Aufreinigung	20
11.	Entsalzen der Proben	20
12.	Konzentrieren des solubilisierten Enzyms	20

III. Charakterisierung des solubilisierten Enzyms

1.	pH-Optimum in verschiedenen Puffern	21
2.	pH-Optimum im gleichen Puffer	21
3.	Substratspezifität der solubilisierten Chlorophyll-Synthetase	21
4.	Substratabhängigkeit der solubilisierten Chlorophyll-Synthetase	21
5.	Untersuchungen zum Einfluß von Salzen und Puffern auf die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase, Anwendung von Schutzsubstanzen	22

III

IV.	Versuche zur Aufreinigung der Chlorophyll-Synthetase	23
1.	Glyceringradientenzentrifugation	23
1.1	Lineare Gradienten	23
1.2	Stufengradienten	23
2.	Ionenaustauschchromatographie	25
2.1	Kationenaustauscher CM 52 Carboxymethyl-Cellulose	25
2.2	Anionenaustauscher DE 52 Diethylamino-Cellulose	25
3.	Molekularsiebchromatographie	27
3.1	Proteinauftrennung mit Sephadex G 100	27
3.2	Proteinaufreinigung mit Sephadex G 200	27
3.3	Proteinaufreinigung mit Sephacryl S 300	27
3.4	Auftrennung mit Biogel A 1,5 m	28
4.	Calcium-Phosphat-Chromatographie (Brushite)	28
5.	Hydroxylapatit-Chromatographie	29
5.1	Bindungsversuche mit Kaliumphosphatpuffer	29
5.2	Bindungsversuche mit Tricinpuffer	30
5.3	Durchführung von Hydroxylapatit-Säulenchromatographien mit Stufengradienten	31
5.4	Durchführung von Säulenchromatographien mit linearen Gradienten	32
5.5	Versuche mit trockenem Hydroxylapatit	32
6.	Weitere Aufreinigungsmethoden	33
6.1	Octyl-Sepharose-Chromatographie	33
6.2	Affi-Gel 10	33
V.	Untersuchungen zum Syntheseort der Chlorophyll-Synthetase	34
1.	Anzucht von Pflanzen, die keine Plastidenribosomen enthalten	34
1.1	Materialien	34
1.2	Durchführung	34
2.	Ernte des Pflanzenmaterials	35
3.	Aufarbeitung	36
4.	Enzymtest	36
5.	Test auf Chlorophyll-Synthetaseaktivität im	

IV

	Envelope aus Erbsenchloroplasten	36
6.	Anzucht von Chloramphenicol-behandelten Pflanzen	36
VI.	Test auf Chlorophyll-Synthetaseaktivität in verschiedenen Alpenpflanzen	37
1.	Ernte und Aufarbeitung des Pflanzenmaterials, Enzymtest und spektroskopische Pigmentbestimmung	37
2.	Dünnschichtchromatographie	38
3.	Auftrennung der Pigmente im HPLC	38
4.	Identifizierung der verschiedenen Substanzen	39
5.	Radioaktivitätsmessung	39
C.	ERGEBNISSE	
I.	Allgemeine Methoden	40
1.	Anzucht und Ernte des Pflanzenmaterials sowie Herstellung der Etioplastensuspension	40
2.	Herstellung des Chlorophyllids	41
II.	Ergebnisse der Solubilisierungsversuche	42
1.	50 % Glycerin	43
2.	Test verschiedener Detergentien zur Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase	45
2.1	LDAO	45
2.2	Triton X 100, n-Octyl-Glucosid, Sulfobetaine SB 12 und SB 14	46
2.3	Digitonin	46
2.4	CHAPS	48
2.5	Brij-Detergentien: Brij 30, 56, 58, W1	49
3.	Versuche zur Stabilisierung des solubilisierten Enzyms	53
3.1	Durch Substratzugabe	53
3.2	Durch Zugabe von Lipid	54
3.3	Durch Zugabe von Glycerin	54
4.	Charakterisierung des mit Brij W 1 solubilisierten Enzyms	55

V

4.1	Untersuchungen zum pH-Optimum	55
4.2	Substratspezifität des solubilisierten Enzyms	56
4.3	Abhängigkeit der Menge des gebildeten Chlorophylls von der zugesetzten GGPP-Menge	57
4.4	Abhängigkeit der Menge des gebildeten Chlorophylls von der zugesetzten PPP-Menge	58
5.	Untersuchungen zum Einfluß von verschiedenen Puffern und Salzen auf die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase	58
5.1	Einfluß von KCl	59
5.2	Einfluß verschiedener Puffer	60
5.3	Salze + Schutzsubstanzen	60
III.	Ergebnisse der Aufreinigungsversuche	63
1.	Glyceringradientenzentrifugation	63
2.	Ionenaustauschchromatographie	68
2.1	Kationenaustausch mit CM 52 Cellulose	68
2.2	Anionenaustausch mit DE 52 Cellulose	69
3.	Molekularsiebchromatographie	71
3.1	Sephadex G 100	71
3.2	Sephadex G 200	73
3.3	Biogel A	73
3.4	Sephacryl S 300	75
4.	Calciumphosphat-Chromatographie (Brushite)	76
5.	Hydroxylapatit-Chromatographie	77
5.1	Anwendung von Stufengradienten	80
5.2	Lineare Gradienten	82
5.3	Chromatographie mit trockenem Hydroxylapatit	85
6.	Hydrophobe Chromatographie und Affinitätschromatographie	86
6.1	Octyl-Sepharose	86
6.2	Affi-Gel 10	86
IV.	Untersuchungen zum Syntheseort und zur Lokalisation der Chlorophyll-Synthetase	87
1.	Untersuchung der Chlorophyll-Synthetaseaktivität in Keimlingen, die bei erhöhter Temperatur angezogen wurden.	88

VI

2.	Untersuchung der Chlorophyll-Synthetaseaktivität in Envelope (Hüllmembranen) aus Erbsen	90
3.	Anzucht von mit Chloramphenicol behandelten Pflanzen	90
V.	Untersuchung der Chlorophyll-Synthetaseaktivität in Hochgebirgspflanzen	91
1.	Veresterung von Chlid und GGPP bei grünen und nicht ergrünzten Pflanzen von <i>Taraxacum alpinum</i> bei 6°, 12°, und 25° C.	93
2.	Hydrierung von Chl _{GG} zu Chl _P	94
3.	Endogener Pigmentgehalt der Pflanzen	96
D.	DISKUSSION	
I.	Solubilisierung und Charakterisierung der Chlorophyll-Synthetase aus Haferetioplasten	98
II.	Aufreinigungsversuche	103
III.	Untersuchungen zum Syntheseort und zur Lokalisation der Chlorophyll-Synthetase	108
IV.	Untersuchungen der Chlorophyll-Synthetaseaktivität in Hochgebirgspflanzen	112
	ZUSAMMENFASSUNG	114
	LITERATURVERZEICHNIS	117

A. Einleitung

Die letzten Schritte der Chlorophyllbiosynthese

1.) Die Protochlorophyllidreduktase

Angiospermen benötigen zum Ergrünen Licht. Zieht man sie im Dunkeln, so kommt es nicht zur Anhäufung von Chlorophyll; vielmehr sind sie gelb gefärbt, was auf die gebildeten Carotinoide zurückzuführen ist. Sie bilden keine Chloroplasten aus, sondern enthalten sogenannte Etioplasten, die durch für sie charakteristische Membranen ausgezeichnet sind, den Prothylakoiden und dem Prolamellarkörper. Als Vorstufe des Chlorophylls findet man Protochlorophyllid (PChlid), das in Dunkeln angehäuft wird. Belichtet man solcher Art angezogene Pflanzen, so setzt umgehend die Umwandlung des Protochlorophyllids zum Chlorophyllid ein. Chemisch gesehen handelt es sich bei dieser Reaktion um eine Reduktion der Doppelbindung am Ring D des Porphyrinchromophors (Schneider 1975). In vivo zeigt sich dabei eine Verschiebung der Absorptionsmaxima, allgemein bekannt als "Shibata-shift" (Shibata 1957). Im etiolierten Stadium findet man vor allem 2 Absorptionsmaxima, abhängig vom Alter der Pflanze, nämlich PChlid_{650 nm} und PChlid_{636 nm}, wobei nur PChlid_{650 nm} direkt photokonvertierbar ist (Schneider 1975). Bei Belichtung treten weitere Zwischenstufen auf, nämlich Chlid_{678 nm}, Chlid_{684 nm} und schließlich Chlid_{672 nm} (Schneider 1975, Oliver und Griffiths 1982). Griffiths (1978) konnte mittels eines in-vitro-Systems aus Gerste alle diese Zwischenstufen reproduzieren. Er konnte zeigen, daß die Reaktion NADPH-abhängig war und aus mehreren Schritten, einem enzymatischen, im Dunkeln ablaufenden und einem lichtabhängigen zusammengesetzt war. Das Enzym, das in vitro die Reduktion des PChlids mittels NADPH katalysierte, erhielt den Namen NADPH-Protochlorophyllid-Oxidoreduktase, wobei das bislang in der Literatur bekannte Protochlorophyllid-Holochrom einem Protochlorophyllidreduktase-Enzym-Substrat-Komplex gleichgesetzt wurde.

Die Aufreinigung dieses Komplexes gelang 1968 Schopfer & Siegelman. Apel beschreibt 1980 die Isolierung und Charakterisierung der NADPH-Protochlorophyllid- Oxidoreduktase aus Gerste mittels Solubilisierung mit Triton X 100 und Anionenaustauschchromatographie. Er identifiziert dabei über SDS-Gelelektrophorese die Reduktase als ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 36.000 Dalton. Griffiths (1981) reinigt das Enzym aus Hafer ebenfalls über Tritonsolubilisierung sowie Gelfiltration und findet dabei ebenfalls ein Molekulargewicht zwischen 35.000 und 37.000 Dalton.

Aufgrund von Versuchen mit aus Haferetioplasten angereicherter PChlid-Reduktase, Zugabe von NADPH bzw. NADP entwickeln Oliver & Griffiths (1982) ein Modell, das versucht, die verschiedenen Absorptionsmaxima, die bei der Belichtung von etiolierten Keimlingen nacheinander auftreten, bestimmten Pigment-Protein-Komplexen zuzuordnen (s. Abb.1)

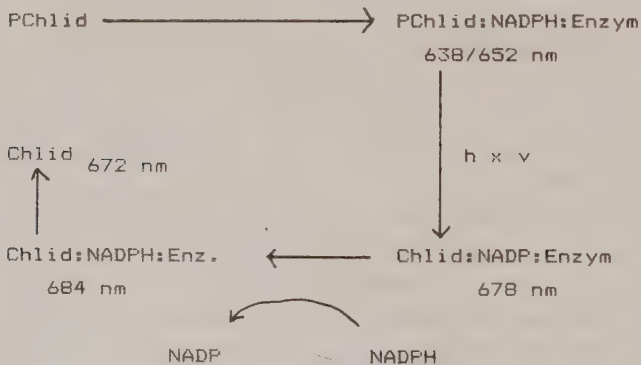


Abb. 1: Schema der Reduktion von PChlid zu Chlid nach Oliver & Griffiths (1982)

Dabei wird PChlid 630 nm , die nichtphotoaktive Form, als freies Protochlorophyllid betrachtet, das im Dunkeln durch Assoziation mit dem Enzymprotein sowie NADPH den photoaktiven Komplex $638/652 \text{ nm}$ bildet. Durch Belichtung entsteht daraus Chlid 678 nm , das einen ternären Komplex aus

Chlid, NADP⁺ und Enzym darstellt. Durch weitere Zugabe von NADPH entsteht Chlid _{684 nm}, was als ein Komplex aus Chlid, NADPH und PChlidreduktase betrachtet wird. Durch Dissoziation entsteht daraus dann freies Chlid mit einem Absorptionsmaximum bei 672 nm (Oliver & Griffiths, 1982). Die Autoren betrachten diesen Mechanismus als eine mögliche Erklärung für den Shibata-Shift.

Übereinstimmung besteht bei mehreren Autoren darüber, daß die Aktivität der Reduktase bei Belichtung in vivo drastisch abnimmt (Santel & Apel 1981, Mapleston & Griffiths 1980). Ebenso nimmt die Enzymmenge in belichteten Pflanzen stark ab. Apel (1981) konnte zeigen, daß dies auf eine phytochromabhängige Abnahme der m-RNA zurückzuführen ist. Mit in-vitro Systemen aus Hafer und Gerste konnte gezeigt werden, daß der proteolytische Abbau des Proteins durch Zusatz der Substrate NADPH und PChlid verhindert werden kann (Kay et al. 1983, Häuser et al. 1984). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird diskutiert, daß die PChlid-Reduktase unter Umständen nur eine vorübergehende Funktion bei der Chlorophyllbiosynthese hat und in grünen Pflnzen durch ein anderes, noch unbekanntes System ersetzt wird (Santel & Apel 1981), bzw. daß die PChlid-Reduktase in grünen Pflanzen zwar in geringer, jedoch für die Biosynthese in ausreichender Menge vorhanden ist (Griffiths et al. 1985, Griffiths & Oliver 1984).

Das Auftreten einer lichtunabhängigen PChlid-Reduktion in Chloroplasten verschiedener Angiospermen wird zur Zeit ebenfalls in Betracht gezogen (Adamson et al. 1980, 1985 a und b), jedoch für Gerste ausgeschlossen (Apel et al. 1984).

2. Die Chlorophyllsynthetase

Wolff & Price (1957) kommen aufgrund von Versuchen mit Bohnen zu dem Schluß, daß als letzte Schritte der Chlorophyllsynthese eine Reduktion des Protochlids zum Chlorophyllid erfolgt und erst dann dieses verestert wird. Mitte der Siebziger Jahre konnten dann Schoch et al.

(1977) erstmals durch in vivo Belichtungsversuche mit etioliierten Haferkeimlingen zeigen, daß das erste Veresterungsprodukt offensichtlich nicht Chl_P sondern Chl_{GG} ist, das dann über die Zwischenstufen Chl_{DHGG} und Chl_{THGG} zum Chl_P hydriert wird. Wellburn (1976) hatte in der Pigmentfraktion aus frisch ergrünzten Kastanienblättern neben Phytol auch Geranylgeraniol nachgewiesen, was ebenfalls auf eine mögliche Veresterung mit GG hindeutete.

Benz et al. (1980 b) zeigten dann die Bildung von markiertem Chl_{GG} und Chl_{DHGG} mit einem in vitro System aus belichteten Etioplastenmembranfraktionen aus Hafer und exogen zugesetztem, radioaktiv markiertem GGPP; sie konnten zeigen, daß durch den Zusatz von NADPH die Mengen an Chl_{DHGG} und Chl_{THGG} erhöht werden können. NADH wurde als Reduktionsäquivalent nur akzeptiert, wenn es zusammen mit ATP appliziert wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Reduktion offensichtlich am Pigment erfolgt und daß nicht schon der freie aktivierte Alkohol hydriert wird. Daß zur Veresterung nur der aktivierte Alkohol GGPP und nicht der freie Alkohol GG oder dessen Monophosphat als Substrat akzeptiert wird, konnten Rüdiger et al. (1980) nachweisen. GG und GGMP wurden nur akzeptiert, wenn sie zusammen mit ATP angeboten wurden. Außerdem zeigten Versuche mit unbelichteten Membranfraktionen und exogen zugesetztem GGPP eindeutig, daß das im Dunkeln vorliegende PChlid nicht zum PChl verestert wird (Rüdiger et al. 1980), d.h. PChlid ist kein Substrat für das veresternde Enzym. Für weitere Isoprenoidalkohole konnten Rüdiger et al. (1980) für das Enzym in Etioplasten eine Substratspezifität von 6 : 3 : 1 für GGPP : PPP : FPP feststellen. Dagegen finden Soll et al. (1983) in Chloroplasten einen bevorzugten Einbau von PPP.

Bezüglich des Chromophoranteils an der Veresterung zeigten Benz & Rüdiger (1981), daß Chlid a und b sowie 3-Acetyl-3-Divinyl Chlorophyllid a gute Substrate für das veresternde System darstellen, während Pyrochlorophyllid a nur schlecht und Bactertiochlorophyllid a, Pheophorbid a und b überhaupt nicht verestert wurden. Damit in Ein-

klang stehen Ergebnisse von Rudoi und Shlyk (1982), die durch Vakuuminfiltration von etiolierten Blättern mit Chlorophyllid a und b und Pheophorbid a ebenfalls feststellen konnten, daß nur erstere 2 als Substrat akzeptiert werden.

Als möglicherweise für diesen letzten Schritt der Chlorophyllbiosynthese verantwortliches Enzym wurde lange Zeit die Chlorophyllase betrachtet, ein bereits 1913 von Willstätter und Stoll beschriebenes Enzym, dessen Hauptreaktion in vitro jedoch ganz auf Seiten der Hydrolyse von Chl zu Chlid + P liegt (Klein u. Vishniac 1961, Holden 1961, Ellsworth 1971, Chiba et al. 1967). Es wurden jedoch auch immer wieder veresternde bzw. umesternde Reaktionen beschrieben (Shimizu & Tamaki 1963, Chiba et al. 1967, Holden 1961, Böger 1965, Ellsworth 1971). Unterschiedlich waren jedoch die Substrate, die angeboten wurden, als auch die pflanzlichen Objekte, aus denen die Chlorophyllase gewonnen wurde. So konnten Chiba et al. (1967) nur Methylchlorophyllid a mit Phytol verestern, während Shimizu & Tamaki angeblich sowohl Chlorophyllid a als auch Pheophorbid a phytylieren konnten.

Mit Skepsis muß die Übertragung von in vitro gewonnenen Ergebnissen mit der Chlorophyllase auf die in vivo Situation verfolgt werden. Die Bedingungen in vitro sind äußerst unphysiologisch: Die Chlorophyllase arbeitet optimal in einem Medium mit 50 % Aceton, eine Bedingung, die für natürliche Verhältnisse unrealistisch ist.

Da eine Vielzahl der Kenntnisse über die Veresterung gegen eine Beteiligung der Chlorophyllase an dieser Reaktion sprach, wurde der letzte Schritt der Chlorophyll-Synthese einem anderen Enzym zugeordnet, das den Namen Chlorophyll-Synthetase erhielt (Rüdiger et al. 1977, Rüdiger, Benz & Guthoff, 1980). Die von Benz & Rüdiger (1981) sowie Rudoi & Shlyk gefundene Substratspezifität spricht gegen die Chlorophyllase als veresterndes Enzym. Auch die Spezifität bezüglich des Alkohols spricht für 2 verschiedene Enzyme für Veresterung und Hydrolyse. Wäh-

rend die Synthetase ausschließlich mit den aktivierten Alkoholen arbeitet (Rüdiger et al. 1977, 1980), akzeptiert die Chlorophyllase diese nicht sondern nur die freien Alkohole (Wellburn, 1970).

Den Mechanismus der veresternden Reaktion untersuchten Akhtar et al. (1984) bei Bacteriochlorophyll. Aufgrund der Ergebnisse mit einer spezifischen Sauerstoffmarkierung kommen sie zu dem Schluß, daß es sich bei der Veresterung nicht um eine hydrolytische Reaktion der Chlorophyllase handelt, sondern um eine Reaktion, bei der ein nucleophiler Angriff eines C-17³ Carboxylat-Sauerstoffs auf einen aktivierten Isoprenoidalkohol erfolgt.

Die Chlorophyllsynthetase konnte außerdem noch in verschiedenen anderen Pflanzen nachgewiesen werden. Kreuz und Kleinig (1981) wiesen Chlorophyllsynthetaseaktivität in Chromoplasten von Narzissen nach und schreiben diese Aktivität einem peripheren Membranprotein zu, das relativ leicht in Lösung geht. Sie finden jedoch keine Reduktion von Chl_{GG}. Dogbo et al. (1982) schließlich zeigen, daß in Chloroplasten und Chromoplasten aus der Frucht des Pfeffers (*Capsicum annuum* L.) ebenfalls Chlorophyll-Synthetaseaktivität nachzuweisen ist. Während in den Chloroplasten die Reaktion mit endogenem Chlid ablaufen kann, benötigen die Chromoplasten exogen zugesetztes Chlid. Bei Zugabe von 50 mM NADPH können sie auch eine Reduktion des Chl_{GG} feststellen.

In Chloroplasten konnte Synthetaseaktivität außerdem von Block et al. (1980), Soll & Schultz (1981) und Soll et al. (1983) nachgewiesen werden.

3. Problem- und Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollte eine weitergehende Charakterisierung der Chlorophyll-Synthetase aus etioliertem Hafer erfolgen.

Insbesondere sollte die Möglichkeit einer Solubilisierung des membrangebundenen Enzyms mit Detergentien sowie die Eignung verschiedener Proteinreinigungsmethoden zur Aufreinigung der Chlorophyll-Synthetase getestet werden.

Desweiteren sollte die Lokalisierung der Biosynthese des Enzyms im Cytosol oder in den Plastiden festgestellt werden.

Schließlich sollte noch das Vorkommen der Chl-Synthetase in verschiedenen anderen Pflanzen, die unter extremen Temperaturen gewachsen waren und die Temperaturabhängigkeit der Veresterungsreaktion untersucht werden.

B. Material und Methoden

I. Allgemein

1.) Anzucht des Pflanzenmaterials

3 l Vermiculith werden mit 2 l Wasser in einer Plastikwanne (30 x 64 x 7 cm) verteilt. Darauf werden ca. 300 g Hafer (*Avena sativa*, L., Sorte Pirol, ungebeizt, Baywa München) gesät und in einem Brutschrank bei 25 ° C (+/- 2 ° C) und maximaler Luftfeuchtigkeit im Dunkeln 7 Tage angezogen.

2.) Ernte

Die Primärblätter der Keimlinge werden circa 4 cm lang abgeschnitten und auf Eis gesammelt. Dies, wie auch alle folgenden Arbeiten erfolgt im grünen Sicherheitslicht.

3.) Bereitung der Etioplastensuspension

3.1. Isolationsmedium

D-Sorbit, reinst (Serva)	450 mM
Albumin bovine, lyophil, rein,	
92 % Serva	2 g/l
Hepes (Sigma, Serva)	50 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O, p.A. (Merck)	1 mM
NaNO ₃ , reinst, (Merck)	1 mM
KH ₂ PO ₄ , p.A. (Merck)	1 mM
NaF, p.A. (Merck)	1 mM
Ascorbinsäure, reinst (Merck)	1 mM
mit KOH auf pH 7,5 einstellen	

3.2. Resuspensionspuffer

Puffer A: Tricin-KOH 1 M pH 7,5. Davon wurde folgender Standardpuffer angesetzt: Tricin 40 mM

Glycerin 10 %

Mercaptoethanol 0,1 %

Puffer B: Tricin-KOH	40 mM
KH_2PO_4 p.A. (Merck)	4 mM
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	10 mM
NaF	10 mM
Ascorbinsäure	2 mM

3.3. Aufarbeitung

Die geernteten Primärblattabschnitte werden mit der Schere auf ca 1 cm lange Stücke geschnitten (auf Eis!). Anschließend gibt man diese in einen gekühlten Mixer (Warring blender oder Mixer gemäß Kannangara et al., 1977) zusammen mit Isolationsmedium (Verhältnis Frischgewicht : Medium = 1: 2) und mixt solange bis ein homogener Zellbrei entsteht. Dieser wird durch ein Nylontuch in ein eisgekühltes Becherglas filtriert. Die groben Zellbestandteile werden verworfen, der Zellsaft wird bei 4000 g 15 Min. abzentrifugiert (Kühlzentrifuge WKF, G 50, eingestellt auf 4° C). Das so erhaltene Pellet wird im Standardpuffer aufgenommen (1 ml Puffer pro 5 g Frischgewicht), gepottert (Potter Elveljem-Homogenisator, 15 ml) und in ca 20 ml Portionen tiefgefroren bei - 20° C.

4. Vorbereitung der Etioplastensuspension

Bevor die Etioplastensuspension weiterverwendet wird, überführt man sie in ein kleines, gekühltes Erlmeyerkölbchen und läßt die Suspension 45 Min. lang auf Eis rühren. Anschließend wird bei 40.000 g abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wird mit gleichem Volumen an Resuspensionspuffer aufgenommen und kann so für weitere Versuche eingesetzt werden.

5. Ultraschallbehandlung

Die vorgereinigte Etioplastensuspension wird mittels eines Sonifiers (Fa. Branson, Sonic power) 1 x 2 s auf Stufe 4 unter Eiskühlung beschallt.

6. Substrate für den Enzymtest

6.1. Zubereitung des Chlorophyllids

6.1.1. Chemikalien, Lösungsmittel

A: 50 % Aceton in 40 mM Tricin-KOH pH 7,5

B: Ether p.A., peroxidfrei

C: Petrolether p.A., 40-60

D: Methanol : 0,01 N NH_3 = 4:1

(58 μl 33 % NH_3 in 100 ml H_2O werden mit Methanol p.A. auf 500 ml aufgefüllt)

E: Ether : Petrolether 1:1

F: Aceton reinst

6.1.2. Durchführung

35 g Bärenklaubblätter (*Herakleum sphondylium*, beste Erntezeit Juni) werden im Mixer zerkleinert (Warringblendor) zusammen mit ca. 400 ml Lösung A. Der so erhaltene Extrakt wird in einen Erlmeyerkolben oder ein Becherglas überführt und 1-2 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird die Lösung abfiltriert. Die Zellbestandteile werden verworfen. Die dunkelgrüne Aceton-Pufferlösung wird in einen Scheidetrichter überführt und mit peroxidfreiem Ether im Verhältnis von 1:1 versetzt. Das Pigment wird dadurch in die Etherphase getrieben. Dieser Schritt kann unter Umständen wiederholt werden. Sodann wird die Etherphase 1:1 mit Petrolether (40-60) wiederum im Verhältnis von 1:1 versetzt und gut durchmischt. Es bildet sich 1 Phase. Im folgenden Schritt werden ungefähr 1/10 Vol. an Lösung D zugegeben, welche die untere Phase bildet; in dieser sammelt sich nun das Pigment. Diesen Schritt wiederholt man 3-4 mal. Die obere, gelbliche Phase wird verworfen. Die alkalische Methanollösung wird nun mehrmals mit ca 1/5 Volumen Lösung E versetzt zur Entfernung der veresterten Pigmente. Im letzten Schritt wird das Pigment aus der alkalischen Methanollösung in Ether überführt. Dazu füllt man in einen Scheidetrichter zunächst etwas H_2O bidest, welches

dann mit Ether überschichtet wird. Dann läßt man die Pigmentlösung langsam mittels eines Glasstabs in den Scheidetrichter laufen. Das Pigment verbleibt in der Etherphase. Die Etherphase wird nochmals 2-3 mal mit H_2O bidest gewaschen. Die grüne Etherlösung wird mit KCl p.A. versetzt und kann so über längere Zeit bei -20° gelagert werden. Sämtliche Arbeiten werden bei abgedunkeltem Raum durchgeführt.

6.2. GGPP, PPP, IPP, FPP

Es wurde GGPP verwendet, das bereits vor Beginn dieser Arbeit im Labor synthetisiert worden war (Rüdiger et al., 1980). PPP, IPP, FPP lagen ebenfalls synthetisiert vor (Benz, 1980).

6.3. NADPH

In Reduktionsversuchen wurde NADPH (Fa. Sigma) angeboten.

7. Enzymtest

7.1. Enzymansatz: Cofaktoren und Substratzugabe

In der Regel wurden pro Ansatz 1 ml Etioplastensuspension (5 nmol PChlid) oder eine Enzymmenge, die aus 1 ml Etioplastensuspension gewonnen wurde, verwendet. Das Volumen/Ansatz betrug 4 ml (mit Ausnahme von wenigen Ansätzen bei der Aufreinigung, wo es bis zu 6 ml betragen konnte). In jedem Falle war es:

4 mM KH_2PO_4
 10 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$
 2 mM Ascorbinsäure
 3 mM $MnCl_2$
 10 mM NaF
 1,3 mM ATP

Pro ml Testansatz wurden 1,5 nmol Chlid und 10 μ l einer GGPP-Lösung (2 mg/ml) zupipettiert. Die Substrate wurden entweder in leicht basischem (ph 7,5) H_2O gelöst (Gronau, 1983), insbesondere in den Solubilisierungsver-

suchen, die kein Brij W1 enthielten, oder aber in einer 0,05 %igen Brij W1 Lösung. Das Volumen dieser Substratlösung betrug insgesamt 200 μ l. Es wurde zum Start der Enzymreaktion zugesetzt. Der Enzymtest erfolgte in einem dünnwandigen Reagenzglas, das mit einem kleinen Rührfisch versehen war. Für Reduktionsversuche wurde zusätzlich NADPH (1 mM) zugesetzt.

7.2. Inkubation

Die Inkubation erfolgte bei allen Ansätzen bei 25° C im Wasserbad unter Rühren. Die Inkubationszeit betrug 15 Min., bei Reduktionsversuchen 45 Min.

7.3. Abstoppen der Reaktion

Die Reaktion wird durch Zugabe von gleichem Volumen Aceton (reinst) gestoppt.

7.4. Überführung der Pigmente in Ether

Die wässrige Acetonlösung wird mit 4-5 ml peroxidfreiem Ether überschichtet und gut durchmischt. Nach der eintretenden Phasentrennung wird die pigmenthaltige Etherfraktion abgezogen und gesammelt. Der Vorgang wird solange wiederholt bis die wässrige, proteinhaltige Phase farblos ist. Die Etherphasen werden mit H_2O bidest acetonfrei gewaschen und daraus das Gesamtpigment spektroskopisch bestimmt.

7.4.1. Behandlung der Proben, die über HPLC weiter aufgetrennt werden

Die gesammelten Etherextrakte werden pro Ansatz mit 1-2 ml 5 %iger HCl versetzt und gut durchmischt. Dabei entsteht aus dem Chlorophyll(id) das magnesiumfreie Pheophytin bzw. Pheophorbid. Die Reaktion ist nach wenigen Minuten quantitativ beendet. Im Anschluß daran wird die Lösung mit H_2O bidest säurefrei gewaschen, über Natriumsulfat oder KCl getrocknet und zur Trockene am Rotations-

verdampfer eingengt. Das Pigment wird in Ether aufgenommen und entsprechend den nicht pheophytinisierten Proben weiterbehandelt.

7.5. Abtrennung des veresterten Pigmentes

Hierzu werden die Proben über den Anionenaustauscher DE 52 gegeben (Säule ϕ = 7mm, Füllhöhe 3-5 cm). Es wird mit mehreren ml Ether nachgewaschen, solange bis das Säulenmaterial wieder farblos ist, mit Ausnahme der obersten Schicht, an die das in der Probe vorhandene, nicht veresterte Pigment (Chlid, PChlid) fest bindet. Das eluierte veresterte Pigment wird quantitativ am Photometer bestimmt.

7.6. Quantitative Pigmentbestimmung

Es wird ein Spektrum von 720 - 520 nm aufgenommen (Perkin-Elmer Spektrophotometer 320, Glasküvetten, 1 cm Schichtdicke). In Anlehnung an die spezifischen Extinktionskoeffizienten von French (1960) kamen folgende molare Extinktionskoeffizienten zur Anwendung.

- $\epsilon_{662} = 90,2$ für Chl und Chlid
- $\epsilon_{624} = 35,3$ für PChl und PChlid
- $\epsilon_{667} = 55,5$ für Phe und Pheid
- $\epsilon_{565} = 22,0$ für PPhe und PPheid

8. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die Elektrophorese der Proteine erfolgte mittel eines Gradientengels (7,5 - 15 %) gemäß Laemmli. Die Geldicke betrug 1,5 mm.

8.1. Vorzubereitende Lösungen

Für die Elektrophorese werden folgende Stammlösungen hergestellt:

A: 30% Acrylamid, 0,8 % Bis: 500 ml

150 g Acrylamid und 4 g Bis-Acrylamid werden in H_2O

bidest gelöst und eine 1/2 Stunde (dunkel) über Aktivkohle gerührt; die Aktivkohle wird anschließend abgetrennt und die Lösung steril filtriert.

B: 60 % Sucrose (w/v)

C: 1,5M Tris/HCl, pH 8,8

D: 10 % APS (Ammoniumpersulfat); stets frisch ansetzen

E: 500 mM Tris/HCl pH 6,8

F: 1 M Tris/HCl pH 8,3

G: 10 % LDS

H: 200 mM Na-EDTA (pH 6,5 - 7,5)

I: TMED (fertige Lösung von Serva)

8.2. Gießen des Gels

Für das Trenngel werden folgende Lösungen zusammenpipettiert:

	7,5 %	15 %
Lsg. A	3,75 ml	7,50 ml
Lsg. B	1,20 ml	3,75 ml
Lsg. C	3,75 ml	3,75 ml
H ₂ O bidest	6,20 ml	-

	entgasen	
TMED	11,25 ul	5,63 ul
Lsg. D	37,50 ul	37,50 ul

	ca. 15 ml	ca 15 ml

Nach gestarteter Reaktion wird das Gel sofort mittels eines 2 Kammern-Gradientenmischers und einer Schlauchpumpe gegossen. Das Gel wird mit H₂O überschichtet um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation (ca. 1 h) wird das Wasser abgegossen und das Trenngel mit dem Obergel überschichtet.

Obergel	5 %
Lsg. A	1,6 ml
Lsg. E	2,5 ml
H ₂ O bidest.	5,8 ml

	entgasen
TMED	5 ul
Lsg. D	75 ul

Zur Ausbildung der Taschen wird ein Kamm zwischen die beiden Glasplatten in das noch flüssige Obergel geschoben.

8.3. Laufpuffer

Anodenpuffer: unten, 1,5 l

25 mM Tris/HCL pH 8,3	1M Lsg. F	50 ml
192 mM Glycin		28,8 g

		ad 2 l

Kathodenpuffer: oben, 0,5 l

25 mM Tris/HCL pH 8,3	
192 mM Glycin	0,5 l Anodenpuffer
0,1 % LDS	Lsg. G 5,0 ml
1 mM NaEDTA	Lsg. H 2,5 ml

8.4. Probenpuffer

	Endkonz.	Vorh. Konz.	davon einges.
Na ₂ CO ₃	50 mM	500 mM	300 ul
DTT	50 mM	1 M	180 ul
SDS	2 %	5 %	
Sucrose	12 %	30 %	300 ul
Bromphenolblau	0,04 %	0,1 %	
60 % Sucrose			600 ul
H ₂ O			1.020 ul

			2.400 ul

Pro Probenauftrag werden davon 60 - 80 μ l benötigt.

8.5. Probenvorbereitung

Die Proteine (50-100 μ g/Spur) wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen mit 20 % TCA gefällt, 2 mal mit Ethanol p.A. gewaschen, in 60 - 80 μ l Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen 1 Min. auf 100° C erhitzt. Anschließend wurden die Proben mittels einer 100 μ l Spritze in die einzelnen Taschen überführt.

8.6. Lauf

Der Lauf erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur unter Wasserkühlung mit ca. 12-16 mA.

8.7. Färben des Gels

1,75 g Coomassie Blue oder Serva Blau R werden in 500 ml Methanol und 70 ml Eisessig gelöst, ungelöste Partikel abfiltriert und die blaue Lösung mit H₂O bidest auf 1 l aufgefüllt. Färbezeit ca. 1 h unter Schwenken.

8.8. Entfärben des Gel

400 ml Methanol

70 ml Eisessig

530 ml H₂O

1 l Entfärbelösung

Darin wird das Gel solange geschwenkt (mehrere Stunden bei Zugabe von Schaumstoffteilen) bis deutliche Banden heraustreten bzw. der Hintergrund nahezu farblos (leicht hellblau) ist.

8.9. Eichproteine

Als Eichstandard wurde ein Mix aus folgenden Proteinen (Konzentrationen der einzelnen Lösungen 5 mg/ml)

zusammenpipettiert.

10 ul Phosphorylase b	97.000
10 ul Rinderserum Albumin	66.000
10 ul Albumin Ei	45.000
10 ul Glc-6-P-DHG	36.000
10 ul Carbonic Anhydrase	29.000
20 ul Trypsinogen	24.000
20 ul Trypsininhibitor	20.000
20 ul Cytochrom c	14.000

davon werden 7,5 ul / Spur eingesetzt.

9. Proteinbestimmung nach Lowry

Lösungen: Lsg. A: 10 % Na_2CO_3 in 0,5 N NaOH lösen

Lsg. B: 2 % K-Na-Tartrat Lsg.

Lsg. C: 1 % CuSO_4

Daraus wird das "alkalische Kupferreagenz" hergestellt:

10 Teile Lsg. A + 0,5 Teile Lsg. B + 0,5 Teile Lsg. C -

Reihenfolge beachten !!!

Folin-Reagenz: 2 N Folin Lösung auf das 5 fache verdünnen.

Durchführung:

- Proteinlösung einpipettieren, mit H_2O auf 500 ul auffüllen.
- 1 ml alkalisches Kupferreagenz zugeben, mixen, mindestens 5 Min. reagieren lassen.
- 1 ml Folin Reagenz zugeben
- Gemisch 30 Min. stehen lassen.

Extinktion bei 750 nm (0,2-25 ug Protein/ml) oder

bei 540 nm (25-200 ug Protein/ml)

gegen einen Nullwert ohne Protein messen.

Eichkurve: Rinderserumalbumin (1mg/ml)

II. Solubilisierung

Sämtliche Versuche zur Solubilisierung wurden im grünen Sicherheitslicht durchgeführt.

1. Solubilisierung mit 50 % Glycerin

Reaktionsvolumen: 2 ml

Reaktionsgefäße: 2 ml Eppendorfhütchen

Etioplastensuspension: 1 ml

Glycerin (99,9 %) : 1 ml

Der Ansatz wird gut durchmischt und 2 x 2 sec beschallt (s. I.5.) Anschließend wird die Lösung 45 Min. lang auf Eis kräftig gerührt und anschließend bei 40.000 g 15 Min. lang abzentrifugiert ($\bar{U}_1$). Dieser Überstand wird 30 Min. lang bei 78.000 g zentrifugiert ($\bar{U}_{uz}$). $\bar{U}_1$ bzw. $\bar{U}_{uz}$ wurden direkt für den Enzymtest verwendet. Dieser wurde mit 4ml Volumen durchgeführt, sodaß die Glycerinkonzentration im Test ungefähr 24 % betrug.

2. Solubilisierung mit LDAO (Lauryldimethylamin-N-Oxid)

Reaktionsvolumen: 2 ml in 2ml Eppendorfhütchen

Etioplastensuspension: 1 ml in Puffer B

Dazu wurden 40, 120, 240 oder 400 μ l einer 5 %igen Detergenzlösung pipettiert und das Volumen mit Puffer C auf 2 ml ergänzt, sodaß Endkonzentrationen an LDAO von 0,1 %, 0,3 %, 0,6 % und 1 % vorliegen. Die Suspension wird 2 x 2 sec. beschallt (s.I.5) und 15 Min. auf Eis kräftig gerührt. Die Zentrifugation erfolgt bei 50.000 g für 45 Min. Der Überstand wird direkt für den Enzymtest verwendet.

3. Solubilisierung mit Triton X 100

Der Ansatz und die Durchführung erfolgte entsprechend Punkt 2. Die Konzentrationen an Triton X 100 betrugen 1 mM, 3 mM und 5 mM (= 0,1, 0,3 bzw. 0,5 %).

4. n-Octyl-Glucosid

Der Ansatz erfolgte wiederum wie in Punkt 2. Die Endkonzentrationen an Detergenz waren 0,2, 0,4, 0,6 und 1 %.

5. Sulfobetaine: SB 12; SB 14

Die Konzentrationen betragen in diesem Falle 0,2, 0,6 und 1 %. Der Ansatz erfolgte in der bekannten Weise.

6. Digitonin

Die Konzentrationen an Detergenz betragen hier zwischen 0,05 und 7 %.

7. CHAPS (3- [(3-cholamidopropyl)dimethylammonio] -1-propanesulfonate) $\times$ 2 H₂O

Die Konzentrationen an Detergenz betragen 0,1 - 0,8 %. Für Stabilitätsuntersuchungen wurden die Überstände eingefroren und nach 3 und 7 Tagen wieder aufgetaut und auf Aktivität getestet.

8. Brij 30, 56, 58 sowie Brij W 1

Die Detergentien wurden im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 2 % getestet.

Temperatur = 4° und 25 ° C

Zeit = 15 und 30 Min.

Für Stabilitätsuntersuchungen wurde Ü₁ eingefroren und nach 3 Tagen für den Enzymtest verwendet.

9. Schutzsubstanzen

Als Schutzsubstanzen wurden folgende Verbindungen eingesetzt:

Lecithin:	20 mg/ml	50 µM
GGFP:	2 mg/ml	10 - 80 µM
NADPH:	25 mg/ml	1 mM

Chlid:	10 µg/ml	1,5 µM
Glycerin:	10 % (v/v)	

10. Standardsolubilisierungsmethode für die weitere Aufreinigung

Die Standardsolubilisierung erfolgte wie folgt:

1. Vorrühren und Ultraschallbehandlung der Etioplasten gemäß Punkt I.4.
2. Zusetzen von 5 %igem Brij W1 auf eine Endkonzentration von 0,1 % Brij W1.
3. 2 x lge Ultraschallbehandlung: 2 x 2 sec, Stufe 4
4. Rühren der Proben auf Eis 15 Min.
5. Zentrifugation der Proben bei 50.000 - 80.000 g

11. Entsalzen der Proben

Zur Entfernung von überschüssigem Detergenz wurde das solubilisirte Enzym bei verschiedenen Versuchen über eine Entsalzungssäule gegeben.

Material: Biogel P-6DG (Polyacrylamid-Desalting-Gel) von Biorad, Bettvolumen 7ml/g, Probevolumen 25 % des Bettvolumens

14 g Biogel werden in 200 ml Standardpuffer aufgenommen und 4-6 h gequollen und anschließend in eine Säule mit 2,5 cm Ø luftblasenfrei eingefüllt. Darauf werden maximal 25 ml solubilisierete Etioplastensuspension aufgetragen ($\bar{U}_{U_2}$) und mit Standardpuffer eluiert. Die Regeneration erfolgt durch ausgiebiges Waschen mit demselben Puffer. Die so behandelte solubilisierete Etioplastensuspension wurde entweder konzentriert oder direkt für weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

12. Konzentrieren des solubilisierten Enzyms

Für verschiedene Versuche (Molekularsiebchromatographie) wurden die Proben vor dem Auftragen auf die Säule konzentriert. Dies erfolgte mittels einer Berghoff-

Konzentrationszelle Nr. 600 1045, Membranfilter Typ Nr. BM 100. Mittels N_2 -Gas wird ein Druck von mehreren Bar angelegt (1-3). Der Konzentrationsvorgang dauerte ca. 1-3 h, je nach Volumen der Probe.

III. Charakterisierung des solubilisierten Enzyms

1. pH-Optimum in verschiedenen Puffern

pH 5,4 und 6,2 in 40 mM MOPS/KOH, 10 % Glycerin, 0,1 % Et-SH		
pH 7,5	in 40 mM Tricin/KOH,	" "
pH 8,5 und 9,3 in 40 mM Tris/HCl,		" "

Nach Punkt I.4. vorgerührte Etioplasten wurden in 1 ml Portionen verteilt, 15 Min. bei 40.000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das P in je 1 ml Puffer der verschiedenen pH's aufgenommen und der Standardsolubilisierung unterworfen. $\bar{U}_1$ wurde auf Enzymaktivität getestet.

2. pH-Optimum im selben Puffer

Hier wurde 40 mM MOPS/KOH, 10 % Glycerin, 0,1 % Et-SH mit pH 6,2, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 und 9,1 für den Test entsprechend Punkt 1 verwendet.

3. Substratspezifität der solubilisierten Synthetase

Als Substrate getestet wurden GGPP, PPP, IPP und FPP im Standardansatz:

Stammlösung: 2 mg/ml, davon wurden 40 μ l im Enzymtest eingesetzt.

Enzymmenge aus 1 ml Etioplasten.

4. Substratabhängigkeit der solubilisierten Synthetase

Getestet wurden 6- 60 μ M GGPP bzw. 3-100 μ M PPP im Standardenzymtest für den ebenfalls solubilisiertes Enzym aus 1 ml Etioplastensuspension verwendet wurde.

5. Untersuchungen zum Einfluß von verschiedenen Salzen und Puffern auf die Aktivität der Chlorophyllsynthetase, Anwendung von Schutzsubstanzen.

Je 1 ml solubilisierter Chl-Synthetase wurde auf folgende molare Konzentrationen an Salzen, Puffern und Schutzsubstanzen gebracht:

- 100 mM KCl
- 500 mM KCl
- 500 mM KCl, 10 mM GGPP
- 500 mM KCl, 50 mM Prolin
- 500 mM KCl, 20 μ M BSA
- 1 M KCl,
- 100 mM LiCl,
- 500 mM LiCl,
- 500 mM LiCl, 50 mM Prolin
- 500 mM LiCl, 50 mM Prolin, 6 μ M Chlid
- 500 mM LiCl, 6 μ M Pheid
- 500 mM LiCl, 6 μ M Chlid_{exogen}
- 50 mM Prolin
- 20 μ M BSA
- 1 mM CaCl_2
- 1 M Tricin pH 7,5
- 500 mM Citrat pH 7,5
- 500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5
- 100 mM Pyrophosphatpuffer pH 7,5

und 1 h bei 4° C inkubiert.

IV. Versuche zur Aufreinigung der Chlorophyllsynthetase

1. Glyceringradientenzentrifugation

1.1. Lineare Gradienten

Sämtliche lineare Gradienten enthielten 10 - 30 % Glycerin im Standardpuffer. Die Schichtung erfolgte mittels eines 2-Kammer-Gradientenmischers und einer Schlauchpumpe. Die Zentrifugation wurde in der Ultrazentrifuge (Kontron, TGA 55) entweder in einem Ausschwingrotor (Kontron TST 28) oder in einem Vertikalrotor (Sorvall TV 850) durchgeführt. Im Ausschwingrotor belief sich das Gradientenvolumen auf 20 ml, das Auftragsvolumen auf 5 ml. Bei Zentrifugationen mit dem Vertikalrotor betrug das Volumen eines Gradienten 32 ml, wobei zunächst 1 Kissen mit 5 ml 30 % Glycerin vorgegeben wurde. Das Auftragsvolumen soll gemäß Hersteller 2-3 ml nicht übersteigen.

1.2. Stufengradienten

Die Stufengradienten enthielten jeweils 3 Stufen und zwar 16/18/22 % oder 16/20/24 % Glycerin in 40 mM Tricin, 0.1 % Et-SH, 0,1 % Brij. Das Volumen der einzelnen Stufen betrug 5 oder 6 ml. Die Zentrifugation erfolgte entsprechend 1.1. Tabelle 1 zeigt die genauen Bedingungen (Volumen, Zentrifugationsdauer etc.) der verschiedenen Zentrifugationen.

Für die Zentrifugation im Vertikalrotor wurden die Proben vor dem Auftragen in der Ultrazentrifuge bei 80.000 g für 30 Min. zentrifugiert, um jegliche Pelletierung während der Vertikalzentrifugation zu unterbinden, da ein eventuell an der Wand entstehendes Pellet den Gradienten verunreinigen könnte, sobald sich Partikel von der Wand ablösen.

Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten in Volumen von 2-3 ml fraktioniert und die einzelnen Fraktionen zur Bestimmung der Enzymaktivität, der Glycerinkonzentration bzw. des Proteingehaltes (Absorption bei λ_{280}) verwendet.

Zur Überprüfung der Dichte der einzelnen Fraktionen wurde eine Dichtebestimmung mittels eines Refraktometers durchgeführt.

Tab. 1: Bedingungen bei den durchgeführten Glyceringradientenzentrifugationen

Gradient	Vol (ml)	Puffer	Detergenz im Puffer	Auftrags- Vol (ml)	Detergenz im AuftragsVol	Zentrifugation Rotor rpm Zeit
1. linear, 10 - 30 %	20	40 mM Tricin 0,1 % Et-SH	-	5, $\bar{u}_1$	+	TST 28, 20.000, 18 h
2. linear, 10 - 30 %	20	-"-	-	5, $\bar{u}_1$	+	TST 28, 20.000, 16 h
3. linear, 10 - 30 %	20	-"-	-	4,5 $\bar{u}_{1konz.}$	-	TST 28, 20.000, 16 h
4. linear, 10 - 30 %	20	-"-	+	6 $\bar{u}_1$	+	TST 28, 28.000, 16 h
5. linear, 10 - 30 %	32	-"-	+	3 $\bar{u}_1$	+	TV 850, 45.000, 2,5 h
6. linear, 10 - 30 %	32	-"-	+	2 $\bar{u}_{UZ}$	+	TV 850, 48.000, 3,5 h
7. Stufe 16/18/22	15	-"-	+	6 $\bar{u}_1$	+	TST 28, 28.000, 14 h
8. Stufe 16/18/22	18	-"-	+	5 $\bar{u}_1$	+	TST 28, 28.000, 3 h
9. Stufe 16/20/24	18	-"-	+	5 $\bar{u}_1$	+	TST 28, 28.000, 3 h

TST 28 20.000 rpm = 100.000 g

TST 28 20.000 rpm = 70.000 g

2. Ionenaustauschchromatographie zur Proteinreinigung

2.1. Kationenaustauscher CM 52 Carboxymethyl-Cellulose (Whatman)

50 g Cellulose wurden gemäß den Vorschriften des Herstellers vorbereitet.

Säule: 0 2,5 cm

Vol.: 40 ml

Equilibrirpuffer: Standardpuffer

Auftrag : 12 ml $\ddot{U}_{UZ}$ wurden entsalzt und in einem Vol. von 15 ml auf die Säule aufgetragen

Waschpuffer : Standardpuffer

Elution : 0 - 0,5 M NaCl im Standardpuffer pH 7,5, je 80 ml

Die Proben wurden in einem Fraktionssammler in 2 ml Proben aufgefangen. Weitere Bindungsversuche wurden bei pH 6,5, 7,0, und 8,2 durchgeführt. Bei pH 8,2 wurde der Versuch zusätzlich mit 0,1 % Brij in allen Puffern durchgeführt.

2.2. Anionenaustauscher DE 52 Diethylamino-Cellulose

Als Material für den Anionenaustausch wurde DE 52 von Whatman verwendet. Er wurde gemäß der Spezifikation des Herstellers vorbehandelt.

Pro g Austauscher wurden 6 ml konzentrierter Puffer (1 M Tricin/KOH, pH 7,5) zugegeben und 2-3 Min. gerührt. Nach dem Absitzen wird der Überstand vorsichtig abdekantiert und der Vorgang noch einmal wiederholt. Dabei wird der Überstand bis auf ca. 20 % abgezogen. Das so behandelte Material wird in dem verbleibenden Puffer vorsichtig resuspendiert und vorsichtig in die Säule gefüllt. Nachdem sich das Bettvolumen gesetzt hat, kann die Säule mit dem gewünschten Puffer equilibriert werden.

Folgende Säulen wurden getestet:

	I	II	III
	Equilibrierpuffer	Auftrag	Elution
2.2.1. DE 52 mit Equilibrierpuffer ohne Detergenz	Standardpuffer	Ü _{UZ} , ent-	0-500mM KCl in I. salzt
2.2.2. DE 52 mit Equilibrierpuffer mit Detergenz	Standardpuffer + Ü _{UZ} 0,1 % Brij		0-500mM NaCl in I.
2.2.3. DE 52 mit Prolin als Schutzsubstanz	Standardpuffer 50mM Prolin	Ü _{UZ}	0-500mM LiCl in I. 0,1 % Brij
2.2.4. DE 52 mit Chlid als Schutzsubstanz	Standardpuffer 0,1 % Brij 6 µM Chlid	Ü _{UZ}	500mM LiCl in I.
2.2.5. DE 52 mit Pheid als Schutzsubstanz	Standardpuffer 0,05 % Brij 6 µM Pheid	Ü _{UZ}	a. 100 mM LiCl in I. + 0,1 % Brij b. 100 mM LiCl in + 0,1 % Brij + 6 µM Chlid
2.2.6. DE 52 mit erniedrigter Ionenkonzentration im Equilibrierpuffer	10 mM Tricin 10 % Glycerin 0,05 % Brij	Ü _{UZ} . 20 mM Tricin 0,05 % Brij	100-400mM LiCl in I, jedoch 0,1 % Brij

3. Molekularsiebchromatographie

3.1. Proteinauftrennung mit Sephadex G 100

20 g Sephadex G 100 (Pharmacia) werden in ca. 450 ml Standardpuffer aufgenommen und ca 1 1/2 h bei 90 °C^o gequollen. Nach dem Abkühlen wird das Gel entgast, die Fines werden abgezogen und die Säule luftblasenfrei gegossen.

Säule: 0: 2,5 cm
 h: 24 cm
 Vol.: 120 ml

Equilibrieren: 3 faches Säulenvolumen, Standardpuffer
 Auftragsvolumen: 10 ml Ü_{UZ} wurden entsalzt, auf 5 ml konzentriert und davon 4,5 ml auf die Säule aufgetragen

Elution: 270 ml Standardpuffer

3.2. Proteinaufreinigung mit Sephadex G 200

8 g Sephadex G 200 (Pharmacia) wurden in 400 ml Puffer aufgenommen und 5 h lang bei 90 °C^o erhitzt. Die weitere Behandlung entspricht Punkt 3.1.

Säule: 0: 2,5 cm
 h: 40 cm
 Vol.: 200 ml

Equilibrieren: 3 faches Säulenvolumen, Standardpuffer
 Auftragsvolumen: 10 ml Ü_{UZ} wurden entsalzt, konzentriert auf 4 ml und davon 3,3 ml aufgetragen.

Elution: 200 ml Standardpuffer

3.3. Proteinaufreinigung mit Sephacryl S 300 (Pharmacia)

Das Material liegt bereits in vorgequollenem Zustand vor. Die Säule kann direkt damit gefüllt werden.

Säule: Ø: 2,5 cm
 h: 61 cm
 Vol. 300 ml

Equilibrieren: 3 faches Säulenvolumen, Standardpuffer
 Auftragsvolumen: 10 ml $\bar{U}_{UZ}$ wurden entsalzt, auf 3,3 ml
 konzentriert und davon 3 ml aufgetragen.
 Elution: ca. 180 ml Standardpuffer

Der Versuch wurde ein weiteres Mal durchgeführt mit
 Standardpuffer, der 0,1 % Brij W1 enthielt. In diesem Falle
 wurde das Auftragsvolumen vor dem Auftrag nicht entsalzt.

3.4. Auftrennung mit Biogel A 1,5 m (Biorad)

Das Gel liegt ebenfalls vorgequollen vor. Die Säule wird
 direkt gefüllt.

Säule: Ø: 2,5 cm
 h: 40 cm
 Vol. 196 ml

Equilibrieren: 3 faches Säulenvolumen, Standardpuffer
 Auftragsvolumen: 10 ml $\bar{U}_{UZ}$ wurden entsalzt, auf 4 ml
 konzentriert und davon 3,3 ml auf die Säule aufgetragen.

Sämtliche Molekularsiebversuche wurden bei 4° C
 durchgeführt. Die Eluate wurden im Fraktionssammler in 3 ml
 Fraktionen gesammelt und zur Proteinbestimmung bzw. für
 den Enzymtest verwendet.

4. Calcium-Phosphat-Chromatographie (Brushite)

Das Material wurde entsprechend der Vorschrift von Siegelman
 et al. (1965) hergestellt.

Bei der Brushite-Chromatographie wurden sämtliche Arbei-
 ten (Aufnehmen der Etioplasten, Solubilisieren und Ent-
 salzen) mit KPP (30 mM KPP, pH 7,5, 10 % Glycerin, 0,1 %
 Et-SH) durchgeführt.

Säule: $\phi = 2,7 \text{ cm}$
 $h = 6 \text{ cm}$
 $\text{Vol.} = 32 \text{ ml}$

Equilibrieren und Waschen der Säule erfolgte mit obigem Puffer.

Auftragsvolumen: 20 ml Ü_{UZ} nach Entsalzen

Elution: 20 ml 5 mM KPP, pH 7,5; Gradient: 5 mM - 500 mM KPP pH 7,5, 10 % Glycerin, 0,1 % Et-SH, je 50 ml.

5. Hydroxylapatit-Chromatographie

5.1. Bindungsversuche mit Kaliumphosphatpuffer

Vorbereitung des Säulenmaterials:

Je 1 ml in Standardpuffer resuspendierter Hydroxylapatit, (Calbiochem, Fast Flow, Dry Powder, Lot 41 00 43) wird in Pasteurpipetten gefüllt und mit Equilibrierpuffer (s.u.) gewaschen.

Vorbereitung der Proben:

Die im Standardpuffer vorliegenden Etioplasten werden abzentrifugiert, das P wird in 10 mM KPP, pH 7,5, 10 % Glycerin und 0,1 % Et-SH aufgenommen und der Standardsonibilisierung unterworfen.

Durchführung der Chromatographie:

a.) Chromatographie ohne Detergenz in den Puffern:

Equilibrierpuffer: 10 mM KPP, pH 7,5
 10 % Glycerin
 0,1 % Et-SH

Elution: a. 100 mM KPP, pH 7,8
 10 % Glycerin
 0,1 % Et-SH

b.) Chromatographie mit Detergenz in den Puffern:

Equilibrierpuffer: 10 mM KPP, pH 7,5

10 % Glycerin
 0,1 % Et-SH
 0,05 % Brij W1

Elution: a. 100 mM KPP, pH 7,8
 10 % Glycerin
 0,1 % Et-SH
 0,1 % Brij W1

Auf jede Säule wird nach dem Equilibrieren 1 ml $\bar{U}_1$ aufgetragen. Das Durchlauf- und Waschvolumen pro Säule beträgt 4ml, das Elutionsvolumen 2,5 ml. Beide wurden auf Enzymaktivität getestet.

5.2. Bindungsversuche mit Tricinpuffer in Abhängigkeit von der Molarität des Puffers.

Vorbereitung des Säulenmaterials:

500 mg Hydroxylapatit werden in 20, 40, 60 und 80 mM Tricinpuffer, pH 7,5, 10 % Glycerin, 0,1 % Et-SH aufgenommen.

Säulen: Pasteurpipetten werden mit dem jeweiligen Material gefüllt.

Vorbereitung der aufzutragenden Proben:

Die Etioplastensuspension wird in 1 ml Portionen auf Eppendorfreaktionsgefäße verteilt und 15 Min. bei 18.000 rpm (WKF) abzentrifugiert. Die so erhaltenen Pellets werden im jeweiligen Tricinpuffer resuspendiert und wie gewohnt solubilisiert.

Durchführung der Chromatographie:

Auf jede Säule wird 1 ml solubilisierter und zentrifugierter $\bar{U}_{UZ}$ aufgetragen, anschließend mit dem jeweiligen Puffer gewaschen und zwar so, daß bei jeder Fraktion 3 ml Durchlauf- + Waschvolumen vorliegen. Die Elution erfolgt bei allen Proben mit 100 mM KPP, pH 7,8, 10 % Glycerin, 0,1 % Et-SH ebenfalls so, daß bei jeder Probe 3 ml Elutionsvolumen vorliegen. Sowohl Durchlauf- und Waschvolumen als auch das Eluat wurden auf Enzymaktivität getestet.

5.3. Durchführung von Hydroxylapatit-Säulenchromatographien mit Stufengradienten

Der Hydroxylapatit (High Resolution, Lot 410 143 von Calbiochem) wurde in 10 bzw. 40 mM Tricinpuffer, 10 % Glycerin, 0,1 % Et-SH suspendiert und entweder sofort oder nach mehreren Tagen verwendet. Mit dem so suspendierten Material wurden Säulen gegossen zwischen 2 und 5 ml Säulenvolumen.

Durchführung der Säulenchromatographie:

Der aus der Standardsolubilisierung erhaltene $\bar{U}_{UZ}$ wurde direkt auf die Säulen aufgetragen. Die Solubilisierung erfolgte entweder in 10 mM oder 40 mM Tricinpuffer durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 10 mM, 30 mM, 50 mM, 70 mM, 100 mM und 200 mM KPP, pH 7,8, der 10 % Glycerin und 0,1 % Et-SH enthielt. Eine Zusammenstellung der Bedingungen zeigt Tabelle 2.

Tab. 2: Bedingungen bei der Hydroxylapatitchromatographie
Elution mit Kaliumphosphatpuffer-Stufengradienten

Säulen- Vol. ml	Equilibrier- puffer	Wasch- puffer	Auftrags- Volumen, ml	Elutions- puffer, ml
1. 1,5	Standard	dito	2	10, 50, 100 mM KPP pH 7,8, je 2 ml
2. 4,5	10 mM Tricin 10 % Glycerin 0,1 % Et-SH	dito	6	30, 50, 70, 100 mM KPP, pH 7,8, je 10ml
3. 3,2	Standard	dito	5	30, 50, 70, 100 200 mM KPP, pH 7,8 je 8, 7, 5, 5, 5 ml
4. 3,5	Standard	dito	5	30, 50, 70, 100 200 mM KPP, pH 7,8 je 9 ml.

Sämtliche Elutionspuffer enthielten ebenfalls 10 % Glycerin, sowie 0,1 % Et-SH.

5.4. Durchführung von Säulenchromatographien mit linearen Gradienten

Die Zusammenstellung der gewählten Bedingungen zeigt Tabelle 3.

Tab. 3: Bedingungen bei der Hydroxylapatitchromatographie
Elution mit linearen Kaliumphosphatpuffergradienten

Säulen- O (cm) h (cm) V (ml)	Equilibrier- puffer	Wasch- puffer	Auftrags- volumen, ml	Elutions- puffer, ml
A. 7,0 34	Standard	dito	32	10-100mM KPP, pH 7,8, 1,5 x Säulenvol.
B. 5,0 24	Standard	dito	25	10-200mM KPP, pH 7,8, 6 x Säulenvol.
C. 19 35	10 mM Tricin pH 7,5	dito	25	10-200mM KPP, pH 7,8, 2 x Säulenvol.
D. 5,5 27	10 mM Tricin pH 8,2	dito	20	10-200mM KPP, pH 8,2, 2 x Säulenvol.

Sämtliche Puffer enthielten 10 % Glycerin und 0,1 % Et-SH.

5.5. Versuche mit trockenem Hydroxylapatit

Hydroxylapatit wird, ohne in Puffer suspendiert zu werden, direkt in die Säule gefüllt. Die solubilisierete Probenlösung wird unmittelbar aufgetragen. Sowohl der Durchlauf als auch das Eluat wurde auf Enzymaktivität getestet.

Durchführung: Hydroxylapatit wurde ca. 1 cm hoch in Pasteurpipetten gefüllt. Darauf wurden 1-2 ml $\bar{U}_1$ aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 100 mM KPP, pH 7,8.

6. Weitere Aufreinigungsmethoden

6.1. Octyl-Sepharose-Chromatographie

Säule: $\phi = 2,5$ cm

h = 10 cm

V = 50 ml (Octyl-Sepharose von Pharmacia)

Auftragsvolumen: 23 ml solubilisierter und entsalzter Etioplastenmembranen wurden auf 6 ml konzentriert und davon 5 ml auf die mit Standardpuffer equilibrierte Säule aufgetragen.

Waschen: 200 ml Standardpuffer

Elution: 0 - 50 % Ethylenglykol in Standardpuffer: 50 ml

50 % " " " : 20 ml

100 % " " " : 20 ml

2 % Brij W1 " " : 20 ml

Regenerieren: 6 M Harnstoff

Ethanol 25-90 %

2 Säulenvolumen n-Butanol

1 " Ethanol

Dest. Wasser

6.2. Affi-Gel 10

0,4 g Affi-Gel 10 (Biorad) werden mit 4,2 μ Mol Pheid (bzw. 4,2 μ Mol Chlid) in 5 ml Aceton 16 h geschüttelt.

Danach wird das Aceton abdekantiert, das Affi-Gel in H_2O aufgenommen und damit eine Säule (Pasteurpipette) mit 1 ml Volumen gegossen. Anschließend wird sie mit H_2O acetonfrei gewaschen und mit 10 mM KPP, pH 7,5 equilibriert.

Auftrag: 1 ml $\bar{U}_{U2}$

Elution: Standardpuffer mit 1,5 μ M Chlid

V. Untersuchungen zum Synthesort der Chlorophyllsynthetase

1. Anzucht von Pflanzen, die keine Plastidenribosomen enthalten.

Die Anzucht erfolgte gemäß den Angaben von Feierabend (1982), entweder im Licht oder im Dunkeln.

1.1. Materialien

- Winterroggen (*Secale cereale* L.) cv. Petkus Kustro, Hafer (*Avena sativa* L.). Die Haferkörner müssen zum Erreichen einer besseren Keimrate entspelzt werden.

- Plastikschalen: $19 \times 19 \times 8,5 \text{ cm}^3$

- Filterpapier: Schleicher & Schüll, Nr. 595, Marke Selecta, $\varnothing$ 24 cm, doppellagig und quadratisch zugeschnitten verwenden.

- 3 % (w/v) frisch zubereitete und abfiltrierte Calciumhypochloritlösung

- Knop's Nährlösung: 1,43 g KNO_3 , 71 mg KCl, 143 mg KH_2PO_4 , 286 mg $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1 ml Fe^{2+} - Komplexierungslösung (695 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ + 930 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ in 100 ml, muß zum Lösen gekocht werden, kann im Kühlschrank aufbewahrt werden; vor jedem Wiederverwenden aufrühren). 1 ml Mikroelementlösung (450 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 150 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 4 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 150 mg H_3BO_4 in 100 ml).

- Brutschrank $\pm 1/2^\circ \text{ C}$ genau, beleuchtbar, mit Befeuchtungseinrichtung.

1.2. Durchführung

Das Saatgut muß zunächst oberflächensterilisiert werden. Dazu wird es mit frisch zubereiteter Hypochloritlösung in einem Becherglas übergossen, dieses in einen Eksiccator gestellt und für 15 Min. unter Vakuum infiltriert. Danach

bleibt es noch 30 Min. in der Lösung stehen. Anschließend werden die Körner mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Sodann werden sie einzeln und mit dem Embryo nach oben auf doppelagigem und mit Nährlösung gut durchfeuchtetem Filterpapier ausgelegt. Der Abstand zwischen den einzelnen Körnern sollte ca. 0,5 - 1 cm betragen. Beachtet man dies nicht, so entwickeln sich die Keimlinge schlecht und die Ausbeuten sind äußerst gering. Außerdem sollte nur qualitativ hochwertigstes Saatgut verwendet werden. Länger gelagertes Saatgut oder beschädigte Keimlinge konnten nicht zum Keimen gebracht werden. Außerdem war es unbedingt erforderlich, die Anzuchtschalen mit Glasplatten abzudecken.

Zum Ankeimen werden die Schalen 24 h lang bei Raumtemperatur ($20 - 25^{\circ}$) ins Dunkle gestellt. Danach werden die Körner, die nicht angekeimt sind, aussortiert und anschließend die Schalen in den Brutschrank mit erhöhter Temperatur überführt.

Die Temperatur des Brutschanks muß auf ein halbes Grad genau konstant gehalten werden, da es sonst zur 70 S Ribosomenbildung kommt, was deutlich am Ergrünen der Pflanzen zu erkennen ist, wenn die Pflänzchen im Licht angezogen werden. Die Anzuchttemperatur betrug 33° C.

Außerdem muß die Feuchtigkeit kontrolliert werden, da die Keimlinge nicht austrocknen dürfen (führt ebenfalls zum Ergrünen) jedoch auch nicht zu feucht gehalten werden dürfen, da sie dann sehr schnell verschimmeln. Nach 7 Tagen werden die Keimlinge geerntet.

2. Ernte des Pflanzenmaterials

Die Keimlinge werden einzeln und in voller Länge geerntet. Dann werden die Spitzen (oberes Drittel) abgeschnitten und vom unteren Teil ($2/3$) die Koleoptile abgezogen. Bei dunkel angezogenen Pflanzen werden Spitzen und untere $2/3$ getrennt auf Eis gesammelt, bei belichteten Keimlingen nur die unteren $2/3$, die Spitzen werden hier verworfen.

3. Aufarbeitung

Die Aufarbeitung erfolgte gemäß Punkt 1.3.3. Das dadurch erhaltene Etioplastenpellet wurde im Standardpuffer resuspendiert und direkt für den Enzymtest verwendet.

4. Enzymtest

Dieser wurde gemäß Punkt 1.7. durchgeführt. Die Inkubationstemperatur betrug 25^o C, die Inkubationszeit 45 Min. Pro Ansatz wurde 1 ml Zellsuspension, die 5 g FG entsprach eingesetzt.

5. Test auf Chlorophyll-Synthetaseaktivität in Envelope aus Erbsenchloroplasten.

100 μ l Envelope (isoliert gem. Nakatani & Barber 1977, Mourioux & Douce 1981, Cline et al. 1981) werden dem Standardenzymtest unterworfen und der Chlorophyllgehalt im Vergleich zu einer nicht inkubierten Probe bestimmt.

6. Anzucht von Chloramphenicol-behandelten Pflanzen

Hafer- und Roggenkörner wurden für 15 Min. mit Chloramphenicol-lösung (1mg/ml - 7mg/ml) infiltriert und anschließend auf Filterpapier, das mit Knop's Nährlösung getränkt wurde, ausgesät. Die Schalen wurden mit Glasplatten abgedeckt und die Keimlinge bei RT im Hellen angezogen. Gießen: Sowohl mit H₂O_{dest} als auch mit Chloramphenicol-lösung.

VI. Test auf Chlorophyll-Synthetaseaktivität in verschiedenen Alpenpflanzen

1. Ernte und Aufarbeitung des Pflanzenmaterials, Enzymtest und spektroskopische Pigmentbestimmung

Folgende Pflanzen wurden auf Chlorophyll-Synthetaseaktivität getestet: *Taraxacum montanum* (Dikotyl), *Eriophorum angustifolium* sowie *Luzula lutea* (beide Monokotyle). Verschiedene Entwicklungsstadien (voll ergrünte Pflanzen, Pflanzen die unmittelbar am Rande von Schneefeldern wuchsen und noch nicht ergrünt waren und solche, die noch vollkommen mit Schnee bedeckt waren und erst ausgegraben werden mußten. Die Pflanzen wurden im Juni und Juli 1985 in ca. 2000 - 2500 m Höhe im Ötztal in der Nähe von Obergurgl gesammelt.

Die Pflanzen wurden, nach Entwicklungsstadien getrennt, geerntet (nach Möglichkeit ohne Wurzel), mit destilliertem Wasser gewaschen und so gut wie möglich getrocknet. Davon wurde dann das Frischgewicht bestimmt. Das geerntete Blattmaterial wurde mit Isoliermedium versetzt, im Mixer homogenisiert, durch ein Gazetuch gepreßt und der Preßsaft in einer Christzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl (ca. 4000 g) 15 Min. lang zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde im Standardpuffer resuspendiert (5 g FG / ml Puffer) und direkt für den Enzymtest verwendet. Der Enzymtestansatz entsprach Punkt I.7.1. An Substraten wurden pro Ansatz 6 nmol Chlid, 75 µl unmarkiertes GGPP (2mg/ml) sowie 150 µl ^{14}C -GGPP (spz. Aktivität 4,7 mCi/nmol, 30 µl = $4,2 \times 10^3$ cpm) sowie 200 µl NADPH (25 mg/ml) zugegeben.

Die Inkubation erfolgte temperaturabhängig bei 6°, 12° und 25° im Wasserbad für 45 Min. Die Reaktion wurde mit Aceton p.A. gestoppt. Danach wurden die Pigmente entsprechend Punkt I.7.4. in Ether übergeführt, gemäß Punkt 7.4.1. in Pheophytine umgewandelt und anschließend entsprechend Punkt I.7.5. und I.7.6. die vorhandene

Pigmentmenge bestimmt.

2. Dünnschichtchromatographie

Nach der photometrischen Pigmentbestimmung werden die Proben zur Auftrennung von Phe a und b sowie den Carotinoiden und freiem ^{14}C -GGPP über Dünnschichtchromatographie gereinigt. Dafür wird den einzelnen Proben als Trägersubstanz ein Pigmentextrakt aus Erbsen beigemischt und alles zur Trockene einrotiert.

Für die Chromatographie kamen Kieselgel G 1500 Platten von Schleicher und Schüll zur Anwendung. Laufmittel: CCl_4 / Aceton 91/9. Die Proben wurden in wenig Aceton p.A. aufgetragen.

Nach dem Lauf wurden Phä a und b von den Platten abgekratzt und 2-3 mal mit Aceton aus dem Kieselgel extrahiert. Die so erhaltenen Proben wurden zur Trockene eingedampft, in destilliertem Aceton aufgenommen und über Watte filtriert. Das Aceton wird mit Stickstoff abgeblasen und die Proben bis zur Durchführung der HPLC bei -16°C im Dunkeln aufbewahrt.

3. Auftrennung der Pigmente im HPLC

Die analytische Auftrennung der Pigmente erfolgte mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).

Geräte: System Waters Königstein

Pumpe: Modell 6000 A 0 - 6000 Psi

Injektor: Rheodyne 7125

Vorsäule: Stahl $50 \times 4,6$ mm, Füllung Lichrosorb 10 μm RP 8

Säule: Stahl, $250 \times 4,6$ mm, Füllung Lichrosorb 7 μm RP 8
(Merck)

Detektor: Latek Heidelberg, Spectro Monitor II

Wellenlänge: 667 nm

Fließgeschwindigkeit: 1,5 ml/min

Elutionsmittel: Methanol / H_2O = 95:5

4. Identifizierung der verschiedenen Substanzen

Die Identifizierung der einzelnen Pheophytine (Phe_{GG} , Phe_{DHGG} , Phe_{THGG} und Phe_{P}) erfolgte mittels Vergleichssubstanzen. Entsprechend deren R_f - Werten wurden am HPLC die einzelnen Peaks der Proben getrennt in Scintillationsgläsern gesammelt und nach Trocknen an der Luft in 1 ml Methanol gelöst und zur Radioaktivitätsmessung verwendet (Benz et al., 1980).

5. Radioaktivitätsmessung

Gerät: Betamatic I, Flüssigkeitsscintillationszähler, Fa. Kontron.

Scintillationscocktail: Rotiscint 22 (PPD, POPOP, Triton X 100, Toluol) Fa. Roth, 10 ml / Probe.

Scintillationsgefäße: Plastik, Fa. Zinsser

Meßzeiten: 5 -10 Min. / Probe

Programm: Nr. 9 (Quench für Chlorophylle berücksichtigt).

C. Ergebnisse

I. Allgemeine Methoden

1. Anzucht und Ernte des Pflanzenmaterials sowie Herstellung der Etioplastensuspension

Für sämtliche Versuche zur Solubilisierung und Aufreinigung wurden 7 Tage alte Haferkeimlinge verwendet, da diese offensichtlich die höchste Aktivität an Chlorophyll-Synthetase enthalten (Benz 1980, Gronau 1983, Keck-eis 1983). Bei der Anzucht wurde darauf geachtet, daß die Keimlinge bei maximaler Luftfeuchtigkeit angezogen wurden. Zu trocken angezogene Keimlinge entwickeln sich schlechter und bringen demzufolge wesentlich geringere Ausbeuten, nicht nur an Frischgewicht, sondern auch an Pigmenten und vermutlich auch an Enzymen.

Bei der Ernte wurde versucht, nur die pigmenthaltigen, oberen Teile der Primärblätter zu ernten, um einen möglichst konstanten Protochlorophyllid-Gehalt pro Gramm Frischgewicht (gFG) zu erhalten. Wurden längere Abschnitte der Keimlinge geerntet, konnte dadurch zwar eine größere Ausbeute an Frischgewicht erreicht werden, jedoch nicht an Protochlorophyllid. Der Protochlorophyllidgehalt wurde jedoch als Maß für die eingesetzte Etioplastenmenge verwendet, um einzelne Ansätze miteinander vergleichen zu können. Dieser Unterschied im Protochlorophyllidgehalt zwischen Blattspitzen und Blattbasis beruht offensichtlich auf einem natürlichen Blattgradienten, der von Deshire et al. (1983) bei Gerste nachgewiesen werden konnte.

Die geernteten Primärblätter wurden mit der Schere in 1 cm große Stücke geschnitten um die Zerkleinerung im Mixer zu erleichtern und durch eine möglichst kurze Mixdauer einen homogenen Zellbrei zu erhalten. Zu langes Mixen beeinträchtigt die Ausbeute an intaktem Pflanzenmaterial stark (Benz 1980). An Isolationsmedium wurden 2 ml pro g

FG zugegeben, in jedem Falle soviel, daß die Keimlingsabschnitte gut mit Medium bedeckt waren.

Das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet wurde im Standardpuffer resuspendiert. Die Menge betrug 1 ml Puffer / 5 g FG. Dadurch konnte pro ml Suspension ein Protochlorophyllidgehalt von ca. 5 nmol erreicht werden; diese Menge wurde als Standardtestansatz für alle Solubilisierungs- und Aufreinigungsversuche verwendet.

2. Herstellung des Chlorophyllids

Das Prinzip der Herstellung beruhte auf der Reaktion der Chlorophyllase, d.h. Chl a und b werden durch die Chlorophyllase in Chlid a und b umgesetzt durch Abspaltung des Alkohols. Durch Zugabe von 50 % Aceton in 40 mM Tricin/KOH, pH 7,5 konnten nicht nur die Reaktionsbedingungen für die Chlorophyllase erreicht werden sondern die Lösung war auch so gepuffert, daß der saure Zellsaft dadurch neutralisiert und eine Pheophytinisierung des Pigmentes somit verhindert wurde.

Die Ausbeute an Chlid a und b aus 35 g Bärenklau (*Hera-
kleum sphondylium*) belief sich auf 8,3 μ mol Chlid. Der Test, ob die Abtrennung des Chlids vom Chl vollständig war, wurde über DE 52 - Chromatographie durchgeführt (B.I.7.5.). Es konnte kein verestertes Pigment mehr nachgewiesen werden, sodaß das gewonnene Chlid direkt für den Enzymtest verwendet wurde.

II. Ergebnisse der Solubilisierungsversuche

Um die einzelnen Solubilisierungsansätze miteinander vergleichen zu können, wurde für alle die standardisierte Etioplastensuspension verwendet, bei der 1 ml 5 g Frischgewicht und ca. 5 nmol PChlid entsprach. Die Menge an Chl, die pro Ansatz gebildet wurde, diente als Maß für die Enzymaktivität der Chlorophyll-Synthetase. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, ist die Enzymaktivität (nmol Chl gebildet / 15 Min.) korreliert mit dem PChlid-Gehalt der Etioplastensuspension.

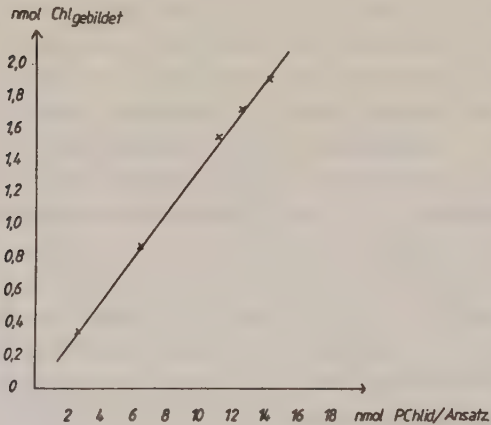


Abb. 2: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Menge an zugesetzter Etioplastensuspension. Steigende Mengen an Etioplastensuspension (PChlid) wurden unter Standardbedingungen ($V = 4$ ml, $T = 25^{\circ}\text{C}$, $t = 15$ Min., Chlid, GGPP = konstant) inkubiert und anschließend die Menge an gebildetem Chl bestimmt.

1. Solubilisierung mit 50 % Glycerin

Die bislang beschriebene Methode, mit der die Chl-Synthetase in aktiver Form solubilisiert werden konnte, bestand in einer Solubilisierung mit 50 % Glycerin (Gronau 1983). Dabei findet Gronau eine Ausbeute von 35 % Enzymaktivität (EA) im Überstand einer 20.000 g Zentrifugation, bezogen auf die EA der nicht solubilisierten Etioplastensuspension.

Tabelle 4 zeigt Werte, die im Laufe dieser Arbeit für identische Solubilisierungsbedingungen der Chl-Synthetase gefunden wurden. Die aufgebrochene und vorgereinigte Etioplastensuspension wurde jedoch zusätzlich mit Ultraschall behandelt. Ungefähr 80 % der Aktivität der nicht-solubilisierten Probe finden sich bei einer solubilisierten Probe nach einer 15 minütigen 40.000 g Zentrifugation im Überstand.

Tab. 4: Gebildetes Chl/5g FG/15 Min. in der nichtsolubilierten Probe bzw. im Überstand der 40.000 g Zentrifugation der mit Glycerin solubilisierten Probe. Werte in nmol Chl.

Nichtsolubilisierter Probe	Überstand
nmol Chl gebildet	nmol Chl gebildet
1,87	1,69
1,15	1,22
1,24	1,15
3,95	2,13
1,44	1,00
2,07	1,46

Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Ausbeute von 80 % an solubilisierter Aktivität.

Literaturangaben darüber, bei welchen Zentrifugationsgeschwindigkeiten und -zeiten gelöste Proteine und partikuläre Bestandteile voneinander getrennt werden, sind nicht

ganz einheitlich. Beer & Griffiths (1981) betrachten eine 30 minütige Zentrifugation bei 38.000 als ausreichend, Hjelmeland (1978) gibt 1 h bei 105.000 g an und Matuo et al. (1985) 1 h bei 100.000. Aufgrund der bestehenden Möglichkeiten wurde hier auf eine 30-45 minütige Zentrifugation bei 75.000 g zurückgegriffen.

Wenn man den Überstand der Glycerinsolubilisierung nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 40.000 g einer 30 minütigen Ultrazentrifugation bei 75.000 g unterwirft, sedimentiert ein Teil der Aktivität, was unter Umständen auf eine nicht ausreichende Solubilisierung zurückzuführen sein dürfte (Tab. 5). Nach diesem Schritt liegt noch eine Enzymaktivität der Chlorophyll-Synthetase von ca. 26 % vor, bezogen auf das nicht solubilisierete Enzym, was eine akzeptable Ausbeute für den nächsten Aufreinigungsschritt darstellt.

Tab. 5: Verteilung der Enzymaktivität bei der UZ-Zentrifugation von mit 50 % Glycerin solubilisierten Etioplasten zwischen Überstand und Pellet. (Werte aus 2 Versuchen).

(Ü + P) UZ	Überstand	Pellet
100 %	16 %	84 %
	37 %	63 %
m =	26 %	74 %

Ein großer Nachteil dieser Methode, der eine andere Art der Solubilisierung sinnvoll erscheinen läßt, ist die Tatsache, daß eine 50 %ige Glycerinlösung für weitere Aufreinigungsschritte wie Säulenchromatographie oder Dichtegradientenzentrifugation zu viskos ist. Die Erniedrigung der Glycerinkonzentration durch Dialyse geht gemäß Gronau (1983) Hand in Hand mit einer Erniedrigung der Enzymaktivität der Chlorophyll-Synthetase auf nur noch 22 %, bezogen auf $\bar{U}_1$. Umgerechnet auf die 26 % an Ausbeute bei der Solubilisierung (siehe oben), bedeutet dies eine Aktivitätsabnahme auf weniger als 10 % der Aktivität einer vergleichbaren, nichtsolubilisierten Etioplastensuspension.

Aus diesem Grunde erschien es sinnvoll, Detergentien auf ihre Fähigkeit zu untersuchen, die Chlorophyll-Synthetase in möglichst aktiver Form zu solubilisieren.

2. Test verschiedener Detergentien zur Solubilisierung der Chl-Synthetase.

2.1. LDAO (Lauryldimethylamin-N-Oxid)

Bereits im Konzentrationsbereich von 0,1 - 0,3 % tritt eine nahezu vollständige Solubilisierung der Membran ein, wenn man die Solubilisierung des ebenfalls membrangebundenen PChlids als Bezugsgröße verwendet. Im Bereich von 0,3 - 1 % Detergenz finden sich 100 % der Menge des in der unbehandelten Membran vorhandenen PChlids im Überstand einer 50.000 g Fraktion. Begleitet wird diese effiziente Solubilisierung jedoch von einer nahezu vollständigen Inaktivierung der Chl-Synthetase. Es finden sich nur mehr 3 % der Menge an verestertem Chlorophyll, die in der nicht solubilisierten Etioplastensuspension gebildet wird. Somit scheidet LDAO als Detergenz zur Solubilisierung einer aktiven Chl-Synthetase aus.

Tab. 6: Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase aus Haferetioplasten mit LDAO. Je 1 ml standardisierte Etioplastensuspension in Standardpuffer wurde mit 0,1 - 1 % LDAO 15 Min. auf Eis gerührt und anschließend bei 50.000 g 45 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde im Standardenzymtest ($V = 4 \text{ ml}$, $T = 25^\circ \text{C}$, $t = 15 \text{ Min.}$, $4 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, 10 mM MgCl_2 , $2 \text{ mM Ascorbinsäure}$, 3 mM MnCl_2 , 10 mM NaF , $1,3 \text{ mM ATP}$, $1,5 \text{ uM Chlid}$, 6 uM GGPP) auf Aktivität getestet.

LDAO	0,1 %	0,3 %	0,6 %	1 %
% Chl _{gebildet}	5,8	3,6	3,6	1,8
% PChlid	86	100	97	100

Gebildetes Chl in 1 ml unsolubilisierter Etioplasten: 2,22 nmol = 100 %
 PChlid-Gehalt von 1 ml unsolubilisierten Etioplasten: 8,15 nmol = 100 %

2.2. Triton X 100, n-Octyl-Glucosid, Sulfobetaine SB 12 und SB 14

Mit 0,1 % - 0,5 % Triton war bei einer ebenfalls quantitativen Solubilisierung der Membran keine Solubilisierung der Synthetase in aktiver Form möglich. Es erfolgte eine quantitative Inaktivierung. Dies steht im Gegensatz zur Solubilisierung der ebenfalls membrangebundenen Protochlorophyllidreduktase, deren aktive Solubilisierung aus der Etioplastenmembran mit 0,1 % Triton X 100 möglich ist (Apel et al. 1980, Beer & Griffiths, 1981).

Die Solubilisierung mit n-Octyl-Glucosid und den Sulfobetainen führte ebenfalls nicht zu einer aktiven Solubilisierung des aktiven Enzyms.

2.3. Digitonin

Bei der Solubilisierung mit Digitonin konnte neben der Solubilisierung der Membran auch eine Aktivität der Chl-Synthetase nachgewiesen werden. Für die Solubilisierung ergaben sich im Konzentrationsbereich 0,2 - 7 % keine signifikanten Unterschiede, wenn man als Bezugsgröße die Menge an solubilisiertem PChlid heranzieht.

Ca. 65 - 70 % des PChlids lagen in solubilisierter Form vor. Im Bereich von 0,05 % bis 0,1 % konnte kein solubilisiertes PChlid nachgewiesen werden. Digitonin beeinträchtigt jedoch, wenn auch in geringerem Maße als LDAD, Sulfobetaine SB 12 und SB 14 und Triton X 100, die Aktivität der Synthetase. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 - 1 % betrug die verbleibende EA noch ca. 23 %. Im Konzentrationsbereich zwischen 2 - 7 % wird die Aktivität offensichtlich noch stärker beeinträchtigt. Es konnten durchschnittlich nur noch ca. 7 % der Enzymaktivität einer vergleichbaren Etioplastensuspension nachgewiesen werden.

Tab. 7: Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase aus Haferetioplasten mit Triton X 100, n-Octyl-Glucosid und den Sulfobetainen SB 12 und SB 14. Die Solubilisierung von je 1 ml Etioplastensuspension erfolgte mit steigenden Detergenzkonzentrationen. GGPP, NADPH, Lecithin und Glycerin wurden als Schutzsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen vor Zugabe des Detergenzes zum Solubilisierungsansatz gegeben. Der Überstand einer 45 min. Zentrifugation bei 43.000 g wurde im Standardenzymtest (s.Tab.6) auf Enzymaktivität getestet.

Triton X 100	: 0,1 %	0,3 %	0,5 %	0,1 % ^a	0,3 % ^a	0,5 % ^a	0,1 % ^{a,c}	0,1 % ^a	0,1 % ^{b,c}
./ Chl gebildet:	0	0	0	0	0	0	0	0	14
./ PChlid sol.:	43	21	119	65	108	76	86	73	95
n-Octyl Glucosid:	0,2 % ^{a,c}	0,4 % ^{a,c}	0,6 % ^{a,c}	1,0 % ^{a,c}					
./ Chl gebildet:	12	27	0	0					
./ PChlid sol.:	43	78	82	91					
Gebildetes Chl in 1 ml unsolubilisierter Etioplastensuspension: 1,77 nmol = 100 %									
PChlid-Gehalt von 1 ml unsolubilisierter Etioplastensuspension: 5,21 nmol = 100 %									
SB 12	: 0,2 %	0,6	1%	0,2 % ^d	0,6 % ^d	1 % ^d			
./ Chl gebildet:	0	0	0	0	0	0			
./ PChlid sol.:	72	55	77	88	88	66			
Gebildetes Chl in 1 ml unsolubilisierter Etioplasten: 1,15 nmol = 100 %									
PChlid-Gehalt von 1 ml unsolubilisierter Etioplasten: 3,27 nmol = 100 %									
SB 14	: 0,2 %	0,2 % ^e	0,2 % ^{a,c,d}	0,6 %					
./ Chl gebildet:	0	0	0	0					
./ PChlid sol.:	138	105	100	132					
Gebildetes Chl in 1 ml unsolubilisierter Etioplasten: 1,97 nmol									
PChlid-Gehalt von 1 ml unsolubilisierter Etioplasten: 7,70 nmol									

a = 80 µM GGPP

b = 160 µM GGPP

c = 1 mM NADPH

d = 10 µM GGPP

e = 50 µM Lecithin

Schutzsubstanzen, die wie unter Punkt C. 11. 3. beschrieben, zugesetzt wurden.

Tab. 8: Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase aus Haferetioplasten mit steigenden Konzentrationen Digitonin. Je 1 ml standardisierte Etioplasten-suspension in Standardpuffer wurde mit Digitonin solubilisiert. Der Überstand einer Zentrifugation bei 43.000 g wurde im Standardenzymtest (s. Tab. 6) auf Enzymaktivität getestet.

Digitonin	0,05 %	0,1 %	0,2 %	0,4 %
% Chl gebildet	9	6	34	17
% PChlid	0	0	71	100
Chl gebildet in 1 ml Etioplastensuspension = 2,92 nmol = 100 %				
PChlid-Gehalt von 1 ml unsolubiliserten Etioplasten = 3,79 nmol = 100 %.				

Digitonin	0,5 %	1 %	2 %	5 %	7 %
% Chl gebildet	25	17	8	0	14
% PChlid	76	64	40	80	77
Chl gebildet in 1 ml Etioplastensuspension = 3,95 nmol = 100 %					
PChlid-Gehalt von 1 ml unsolubilisierten Etioplasten = 5,92 nmol = 100 %					

2.4. CHAPS (3- [(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat)

Durch die Solubilisierung mit 0,1 % CHAPS konnte die Chl-Synthetase in aktiver Form solubilisiert werden. (Tabelle 9). Die Ausbeute an Enzymaktivität betrug hierbei ca. 75 %, bezogen auf eine nicht solubilisierete Etioplastensuspension. Bei höheren Konzentrationen (0,2 - 0,8 %) erfolgte wiederum eine Inaktivierung der Synthetase.

Tab. 9 : Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase aus Haferetioplasten mit CHAPS. Je 1 ml standardisierte Etioplastensuspension wurde 15 Min. auf Eis solubilisiert. Der Überstand einer 45 minütigen Zentrifugation bei 43.000 g wurde im Standardenzymtest (s. Tab. 6) auf Enzymaktivität getestet.

CHAPS	0,1 %	0,1 %	0,2 %	0,4 %	0,8 %
GGFP, 80 μ M	+	-	-	-	-
Lecithin, 50 μ M	+	-	-	-	-
Glycerin 10 %	+	-	-	-	-
% Chl _{gebildet}	52	48	22	0	0
PChlid-Gehalt nicht bestimmt					
Chl _{gebildet} in 1 ml unsolubilisierter Etioplasten: 1,20 nmol = 100 %					

Ein Nachteil, der sich bei der Solubilisierung mit CHAPS ergibt, ist ähnlich der Solubilisierung mit 50 % Glycerin. Der größere Anteil der Aktivität sedimentiert ebenfalls bei 78.000 g, was wiederum daraufhindeutet, daß ein größerer Anteil der Aktivität nicht solubilisiert ist. Die Ausbeute an solubilisierter Enzymaktivität erscheint zu gering, sodaß das Detergenz zur Solubilisierung der Chl-Synthetase nicht optimal erscheint.

Tab 10: Verteilung der Enzymaktivität bei der UZ-Zentrifugation bei 78.000 g von mit 0,1 % CHAPS solubilisierten Etioplasten zwischen Überstand und Pellet.

	(Ü + P) _{UZ}	Überstand	Pellet
% Chl _{gebildet}	100 %	25 %	75 %
100 % Chl _{gebildet} = .44 nmol Chl			

2.5. Brij - Detergentien: Brij 30, 56, 58, W1

Bei der Solubilisierung mit Brij 30, 56 und 58 ergab sich zwar eine nahezu vollständige Solubilisierung der Membran, wiederum in Bezug auf die Menge an solubilisiertem

PChlid. Es konnte jedoch kein aktives Enzym mehr nachgewiesen werden. (Siehe Tab. 11).

Tab. 11: Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase aus Haferetioplasten mit Brij 30, 56 und 58. Je 1 ml standardisierte Etioplastensuspension in Standardpuffer ohne Glycerin wurden 15 Min. auf Eis gerührt. Der Überstand einer 45 minütigen Zentrifugation bei 43.000 g wurde im Standardenzymtest (s. Tab. 6) auf Enzymaktivität getestet.

	Brij 30	Brij 56	Brij 58
	0,2 %	0,2 %	0,2 %
% Chl gebildet	0	0	0
% PChlid	85	105	100

Gebildetes Chl in 1 ml unsolubilisierter Etioplasten = 1,60 nmol = 100
 PChlid-Gehalt von 1 ml unsolubilisierten Etioplasten = 3,85 nmol = 100
 Sämtliche Ansätze enthielten 80 µM GGPP, 1 mM NADPH, 50 µM Lecithin

Anders war es bei Brij W1, obwohl dieses Detergenz zur selben Klasse von Detergentien gehört (Polyoxyethylenether). Bei einer Konzentration von 0,1 % konnte eine Enzymaktivität von durchschnittlich 75 % in der solubilisierten Etioplastensuspension festgestellt werden (Tab. 12 b). Konzentrationen zwischen 0,4 und 2 % führten bereits wieder zu einer Abnahme der Enzymaktivität (Tab. 12 a).

Tab. 12a: Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase aus Haferetioplasten mit Brij W1. Je 1 ml Etioplasten in Standardpuffer wurde 15 Min. bei 40 °C gerührt. Der Überstand einer 45 minütigen Zentrifugation bei 43.000 g wurde im Standardenzymtest (s. Abb. 6) auf Enzymaktivität getestet.

Brij W 1	0,1 %	0,4 %	0,6 %	1 %	2 %
% Chl gebildet	132	53	54	17	14
Gebildetes Chl in 1 ml unsolubilisierter Etioplasten = 1,31 nmol = 100 %					

Tab. 12b: Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase aus Haferetioplasten mit 0,1 % Brij W1. Die angegebenen Enzymaktivitäten (nmol Chl) beziehen sich auf je 1 ml Etioplasten (unsolubilisiert bzw. Überstand nach Zentrifugation der solubilisierten Etioplasten), die im Laufe von verschiedenen Versuchsreihen ermittelt wurden.

Unsolubilisierete Etioplasten	Überstand	% Ausbeute
nmol Chl _{gebildet}	nmol Chl _{gebildet}	
1,64	1,04	63
1,86	2,03	109
1,73	1,11	64
1,46	0,53	36
1,02	0,58	57
0,88	0,28	32
1,77	0,88	50
1,31	0,63	47
2,20	0,88	40
0,91	0,38	42
0,95	0,88	93
1,31	1,73	132
0,97	0,60	67
2,08	1,73	83
1,86	0,78	42
1,90	1,40	74
1,80	3,00	166
1,50	2,30	153
m = 75 % Solubilisierung		

Außerdem konnte gezeigt werden, daß der Hauptanteil der Enzymaktivität bei einer Zentrifugation bei ca. 75.000 g nicht sedimentiert, sondern sich im Überstand befindet, ganz im Gegensatz zur Solubilisierung mit 50 % igem Glycerin oder mit CHAPS (Tab. 13).

Tab. 13: Verteilung der Enzymaktivität nach der UZ-Zentrifugation bei 78.000 g von mit 0,1 % Brij W 1 solubilisierten Etioplasten zwischen Überstand und Pellet

$(\bar{U} + P)_{UZ}$	Überstand	Pellet
100 %	70 %	30 %
100 % = 0,42 nmol Chl		

Im Hinblick auf eine Optimierung der Solubilisierungsbedingungen wurde die Solubilisierung bei verschiedenen Temperaturen, nämlich 0° und 25° C durchgeführt. Es ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede in der Enzymaktivität. Die Solubilisierung wurde 15 Min. und 30 Min. lang durchgeführt. Auch hier war der Unterschied nicht signifikant (siehe Tab. 14).

Tab. 14: Solubilisierung von Haferetioplasten mit 0,1 % Brij W 1 bei 0° , 25° , 15 Min. bzw. 30 Min. Die Solubilisierung erfolgte mit je 1 ml Etioplasten im Standardpuffer. Der Überstand der 78.000 g Zentrifugation wurde auf Chlorophyll-Synthetaseaktivität getestet (s. Tab. 6).

Bedingungen:	15', 0°	30', 0°	15', 25°
% Chl _{gebildet}	59 %	69 %	58 %
100 % = Enzymaktivität der nicht solubilisierten Etioplasten (= 2,53 nmol Chl).			

Als Standardsolubilisierung für alle weiteren Versuche kamen schließlich folgende Bedingungen zur Anwendung:

Konzentration von Brij W1: 0,1 %

Beschallen mit Ultraschall: 3 x 2 sec., Stufe 4, (1 x vor Zugabe des Detergenzes, 2 x nach Zugabe des Detergenzes).

Temperatur: 4° C

Zeit: 15 Min.

Zentrifugation: 45 Min. zwischen 50.000 und 78.000 g

Puffer: Standard (40 mM Tricin/KOH, pH 7,5, 10 %

Glycerin, 0,1 % Et-SH.

3. Versuche zur Stabilisierung des solubilisierten Enzyms

Membranproteine sind in Lösung sehr viel empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen als in der Membran. Sehr oft werden deshalb Versuche unternommen, um das in Lösung befindliche Protein zu stabilisieren. Hierzu herangezogen werden bei Enzymen häufig deren Substrate oder Substratanaloga. Apel et al. (1980) beschreiben für die Solubilisierung und Aufreinigung der PChlid-Reduktase, daß diese nur in Gegenwart von PChlid und NADPH in aktiver Form erhalten werden kann. Allgemein bekannt ist auch, daß viele Membranproteine Lipide benötigen, um aktiv zu sein (Sandermann 1983). So konnten Steiger et al. (1985) eine Aktivierung der GGPP-Synthese in Kürbis durch Lecithin nachweisen. Pfeiffer et al. (1982) konnten den Glycin-Rezeptor aus dem Rückenmark von Ratten durch die Zugabe von Phosphatidylcholin stabilisieren.

Eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung von Membranproteinen in Lösung besteht in der Zugabe von Glycerin. Apel et al. (1980) verwendet für die Solubilisierung der PChlid-Reduktase einen Puffer, der 20 % Glycerin enthält. Michel (1984) führt diese Stabilisierung darauf zurück, daß Glycerin in Detergenzlösungen eine Phasentrennung in eine detergenzangereicherte und eine detergenzverminderte Fraktion verhindert. Zu allen 3 Bereichen wurden Versuche während der Solubilisierung der Synthetase durchgeführt. (S. Tab. 7 - 13).

3.1. Versuche zur Stabilisierung der Synthetase während der Solubilisierung durch Substratzugabe

Bei verschiedenen Solubilisierungsversuchen wurde entweder GGPP (80 μ M), NADPH (1mM) oder eine Kombination von GGPP und NADPH zugegeben, um diese auf eine stabilisierende Wirkung auf die Synthetase zu prüfen. NADPH wurde unter dem Gesichtspunkt, daß die Synthetase eventuell auch die Reduktion des Geranylgeraniols zum Phytol katalysiert, als mögliches Substrat betrachtet und getestet. Es konnte unter keinen Umständen eine stabilisierende

Wirkung der Substrate bezüglich der Enzymaktivität festgestellt werden. Bei Detergentien, die ohne Substratzugabe zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms führten (z.B. Triton X100, Tab. 7), konnte auch durch Substratzugabe keine Stabilisierung der Enzymaktivität erreicht werden. Die Substratzugabe erfolgte in allen Fällen vor Zugabe des Detergenzes.

3.2. Versuche zur Stabilisierung der Synthetase während der Solubilisierung durch Zugabe von Lipid.

Bei verschiedenen Solubilisierungsansätzen (Tab. 7, 9, 11) erfolgte die Zugabe von Lecithin (50 μ M) (Steiger et al. 1985) bzw. eine kombinierte Zugabe von Lecithin mit GGPP (80 μ M) und NADPH (1mM) zum Solubilisierungsansatz ebenfalls wieder vor Zugabe des Detergenzes. Auch hier konnte in keinem Fall ein positiver Effekt des Lipids hinsichtlich der Stabilität und Aktivität der solubilierten Chlorophyll-Synthetase festgestellt werden.

3.3. Versuche zur Stabilisierung der Synthetase während der Solubilisierung durch Zugabe von Glycerin.

In Anlehnung an Versuche mit der FChlid-Reduktase, (Apel et al. 1980) und Beer & Griffiths (1981) wurde versucht, die Synthetase durch Zugabe von niedrigen Konzentrationen an Glycerin (3-10 %) zu stabilisieren. Die dabei erzielten Ergebnisse deuten daraufhin, daß Glycerin tatsächlich einen schützenden Effekt auf die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase bewirkt.

Dies konnte in Ansätzen festgestellt werden, in denen versucht wurde, das solubilierte Enzym über mehrere Tage aktiv zu halten. Dabei zeigte sich, daß bei Solubilisierung mit 0,1 % CHAPS ohne Glycerin nach 3 Tagen kein aktives Enzym mehr nachgewiesen werden konnte, während bei Solubilisierung mit 0,1 % CHAPS in einem Puffer, der 10 % Glycerin enthielt, die Aktivität nach 3 Tagen noch 87 % und nach 7 Tagen noch 53 % betrug, bezogen auf die Aktivität am Tage der Solubilisierung (= 1,24 nmol Chl).

Aufgrund dieses Befundes wurden sämtliche Solubilisierungsversuche mit Brij W1 bereits mit glycerinhaltigem Puffer durchgeführt.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in den Tabellen 7 - 9 enthalten.

4. Charakterisierung des mit Brij W 1 solubilisierten Enzyms

4.1. Untersuchungen zum pH-Optimum

Das solubalisierte Enzym wurde bei verschiedenen pH - Werten auf Aktivität getestet. Der ausgetestete Bereich von pH 5,4 - 9,3 wurde einmal mit demselben Puffer erreicht (MOPS) bzw. mit 3 verschiedenen Puffern (MOPS, Tricin, Tris) getestet. Die dabei erhaltenen Werte deuten daraufhin, daß die Chl-Synthetase im physiologischen Bereich kein ausgeprägtes pH-Optimum besitzt. Allerdings wurde beim pH-Wert von 6,2 nur mehr wenig Chl (11 % bezogen auf die Menge bei pH 7,5) gebildet bzw. bei pH 5,4 überhaupt kein Chl mehr nachgewiesen. Daraus wird deutlich, daß entweder das Enzym im pH-Bereich unter 7,0 nicht sehr stabil ist, oder die erhöhte Instabilität des Substrates GGPP bei pH-Werten unter 7 (Benz 1980 a) zu der verringerten Aktivität führt .

Die verschiedenen getesteten Puffer scheinen auf die Aktivität des Enzyms keinen Einfluß zu haben. (Tab. 15)

Tab. 15: pH-Abhängigkeit der Chlorophyll-Synthetase in verschiedenen Puffern.

Je 1 ml Etioplastensuspension wurde 15 Min. bei 43.000 g zentrifugiert, das Pellet in 1 ml Puffer mit dem jeweiligen pH der 10 % Glycerin und 0,1 % Et-SH enthielt resuspendiert und der Standardsolubilisierung unterworfen. Der 78.000 g Überstand wurde im Standardenzymtest (s. Abb. 6) auf Enzymaktivität getestet.

	pH	Enzymaktivität nmol Chl / 15 min.
MOPS/KOH	5,4	0
	6,2	0; 0,18
	7,0	1,37
	7,5	1,55
Tricin/KOH	7,5	1,81; 1,75
MOPS/KOH	8,0	1,42
	8,5	1,15
Tris/HCl	8,5	1,86
MOPS/KOH	9,1	1,66
TRIS/HCL	9,3	1,77

4.2. Substratspezifität des solubilisierten Enzyms

Neben dem Standardsubstrat GGPP wurden auch die weiteren Isoprenoidalkohole IPP, FPP und PPP darauf getestet, ob sie vom solubilisierten Enzym als Substrat akzeptiert werden. Benz (1980 b) konnte zeigen, daß membrangebundene Chlorophyll-Synthetase in Haferetioplasten sowohl GGPP als auch PPP als Substrat akzeptiert. In Spinatchloroplasten ist das bevorzugte Substrat PPP (Soll et al. 1983).

Die mit 0,1 % Brij W1 solubilisierete Chlorophyll-Synthetase zeigte eine nahezu gleiche Affinität zu GGPP wie zu PPP mit einer leichten Präferenz von GGPP, wie aus folgenden Daten hervorgeht:

Enzymaktivität: nmol Chl / 15 Min.

GGPP ($6 \mu\text{M}$): 0,44; 1,06; 0,28; $m = 0,60 \text{ nmol} = 100 \%$

PPP ($6 \mu\text{M}$): 0,15; 0,66; 0,58; $m = 0,46 \text{ nmol} = 75 \%$

Die Daten beruhen auf 3 verschiedenen Experimenten.

Bei FPP und IPP konnte keine meßbare Veresterung festgestellt werden.

4.3. Abhängigkeit der Menge des gebildeten Chlorophylls von der zugesetzten GGPP-Menge

Solubilisierete Synthetase wurde im Standardenzymansatz mit steigenden GGPP-Mengen inkubiert. Dabei zeigte sich im Bereich von $6 \mu\text{M}$ - $24 \mu\text{M}$ bereits eine Sättigung. Bei Zusatz von größeren Mengen GGPP nahm die Menge an gebildetem Chlorophyll wieder ab. Die zugesetzte Menge an Chlid betrug $1,5 \text{ nmol / ml}$ ($= 1,5 \mu\text{M}$), sodaß der Sättigungsbereich bei einem 4-16 fachen Überschuß an GGPP gegenüber Chlid erreicht wird (Abb.3).

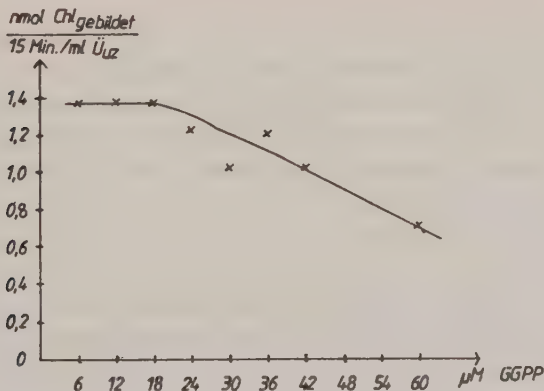


Abb. 3: Abhängigkeit der Enzymaktivität (nmol Chl / 15 Min.) von der Konzentration des GGPP. Pro Ansatz wurde 1 ml des 78.000 g Überstandes aus der Standardsolubilisierung im üblichen Enzymtest (s. Tab. 6) mit den angegebenen Konzentrationen (μM) an GGPP für 15 Min. inkubiert.

4.4. Abhängigkeit der Menge des gebildeten Chlorophylls von der zugesetzten PPP-Menge

Auch bei Zugabe von PPP als Substrat lag das Maximum der Chlorophyllbildung im gleichen Konzentrationsbereich wie bei GGPP. Die insgesamt gebildete Chlorophyllmenge lag auch hier etwas unter der von GGPP (1,0 nmol gegenüber 1,3 nmol), (Abb. 4).

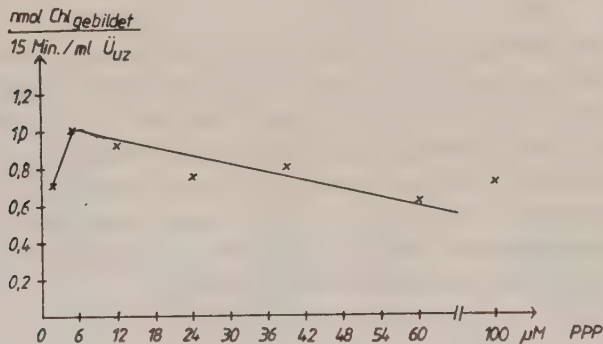


Abb. 4: Abhängigkeit der Enzymaktivität (nmol Chl) von der Konzentration des PPP. Pro Ansatz wurde 1 ml des 78.000 g Überstandes aus der Standardsolubilisierung im üblichen Enzymtest (s. Tab. 6) mit den angegebenen Konzentrationen (μM) an PPP 15 Min. lang inkubiert.

5. Untersuchungen zum Einfluß von verschiedenen Puffern und Salzen auf die Aktivität der Chlorophyllsynthetase

Bei der Ionenaustauschchromatographie zur Auftrennung von Proteinen wird die Desorption in der Regel durch eine Erhöhung der Ionenstärke durch Salzgradienten oder konzentrierte Puffer erreicht. Das gewünschte Protein sollte deshalb salzstabil sein, um in aktiver Form desorbiert werden zu können.

5.1. Einfluß von KCl

Zunächst wurde der Einfluß von verschiedenen Konzentrationen KCl auf die Aktivität der solubilisierten Synthetase untersucht. (Abb. 5).

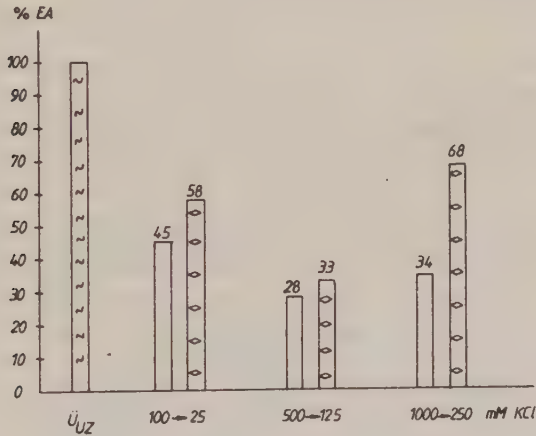


Abb. 5: Einfluß von KCl auf die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase. Je 1 ml eines 78.000 g Überstandes von mit 0,1 % Brij W1 solubilisierten Etioplasten wurde mit 100, 500 bzw. 1 M KCl 30 Min. bei 4° C inkubiert. Der Enzymtest (Tab. 6) erfolgte anschließend bei derselben KCl-Konzentration bzw. bei einer Verdünnung von 1:4 durchgeführt . Ü_{ÜZ} entspricht dem Kontrollwert ohne KCl . EA = Enzymaktivität. Die Anzahl der Meßwerte bei den einzelnen Versuchen beläuft sich auf 2-5.

Im Vergleich zum nicht mit Salz behandelten Enzym sank die Enzymaktivität bereits bei 1/2 stündiger Einwirkung von 100 mM auf ca. 50 %. Durch Verdünnung auf 25 mM KCl konnte eine minimale Steigerung erreicht werden. 500 mM und 1 M KCl führten bei diesen Versuchen zwar nicht zu einer vollständigen Inaktivierung, ließen die Aktivität aber etwas weiter abnehmen. Nur noch ca. 30 % der Aktivi-

tät einer Vergleichsprobe konnten wiedergefunden werden. Eine Reversibilität durch Verdünnen konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Um eventuell doch Bedingungen zu finden, die von der Chl-Synthetase toleriert werden, wurden weitere Versuche mit verschiedenen Salzen, Schutzsubstanzen und konzentrierten Puffern durchgeführt.

5.2. Einfluß verschiedener Puffer

Die Synthetase wurde auf Verträglichkeit gegenüber konzentrierten Puffern getestet. Dabei zeigte sich eine Empfindlichkeit gegenüber allen getesteten Puffern, wie aus folgenden Daten hervorgeht:

Tab. 16: Einfluß konzentrierter Puffer auf die Enzymaktivität. Das Enzym aus 1 ml Etioplastensuspension wurde in je 1ml des jeweiligen Puffers aufgenommen und 30 Min. lang inkubiert.

	Enzymaktivität
Vergleichswert:	100 %
500 mM Citrat, pH 7,5	12 %
500 mM KPP, pH 7,5	5 %
100 mM Pyrophosphatpuf. pH 7,5	5 %
1 M Tricin pH 7,5	5 %
100 % Enzymaktivität = 2,3 nmol	

5.3. Salze + Schutzsubstanzen

LiCl, als weiteres Salz getestet, wird von der Synthetase ebenfalls nur bedingt toleriert (s. Abb. 6a); die Menge des gebildeten Chlorophylls liegt jedoch um ca. 10 % höher als bei KCl, nämlich bei ca. 43 %.

Die Empfindlichkeit gegenüber Salzen und konzentrierten Puffern kann unter Umständen durch verschiedene Substanzen verhindert werden. Als Schutzsubstanzen wirken häufig wieder die natürlichen Substrate der Enzyme (Apel et al. 1980). Prolin kann ähnlich schützend wirken wie Glycerin

(Michel 1984).

Beim Test der verschiedenen Substanzen wurde neben den natürlichen Substraten GGPP und Chlid auch noch Pheid getestet sowie die Aminosäure Prolin und Rinderserumalbumin. Mit GGPP und Pheid konnte kein nennenswerter Unterschied zu den nur mit Salz behandelten Ansätzen festgestellt werden. Die Abnahme der Enzymaktivität nach einstündiger Inkubation lag überall bei ca. 60 % (s. Abb. 6b).

Einen positiven Effekt auf die Stabilität scheinen Prolin, BSA und in geringerem Maße auch Chlid auszuüben. Die Abnahme der Aktivität belief sich bei Chlid auf 40 ~ 45 %, bei BSA und Prolin auf maximal 20 % (s. Abb. 6a und 6b), bezogen auf einen Vergleichswert im Standardpuffer.

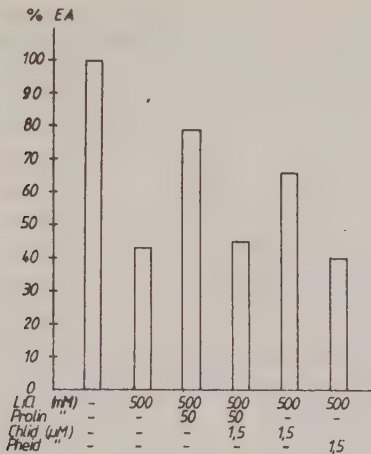


Abb. 6a: Der Einfluß von LiCl mit und ohne Prolin, Chlid sowie Pheid auf die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase. Je 1 ml eines 78.000 g Überstandes von mit 0,1 % Brij W1 solubilisierten Etioplasten wurde mit LiCl, Prolin, Chlid und Pheid in den angegebenen Konzentrationen 1 h bei 4°C inkubiert. Der Enzymtest erfolgte gem. Tab. 6 bei einer 1:4 Verdünnung. Der Kontrollwert (=100 % Enzymaktivität) entspricht einem Ansatz ohne zugesetzte Substanzen. Anzahl der Meßwerte: 2-5

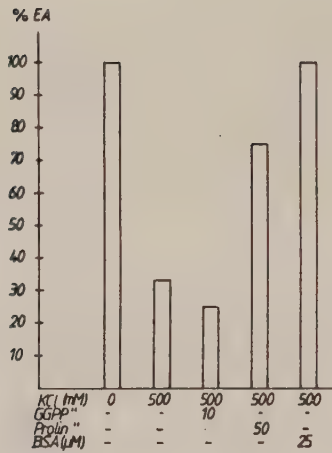


Abb. 6b: Der Einfluß von KCl mit und ohne GGPP, Prolin, sowie BSA auf die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase. Die Proben wurden analog Abb. 6a behandelt.

III. Ergebnisse der Aufreinigungsversuche

1. Glyceringradientenzentrifugation

Auf Reinigungsversuche mit Glyceringradienten wurde deshalb zurückgegriffen, weil aus den Solubilisierungsversuchen hervorging, daß Glycerin zur Stabilisierung des Enzyms beiträgt. Außerdem beschreiben Apel et. al. (1980) die Glyceringradientenzentrifugation als eine Methode zur Anreicherung der PChlid-Reduktase.

Zunächst wurden 10 - 30 % ige Glyceringradienten in Standardpuffer ohne Detergenz verwendet. Auf Detergenz wurde verzichtet, da die Stabilität des Enzyms in Detergenzlösung über längere Zeit hinweg abnimmt (Dauer einer Zentrifugation im Ausschwingrotor: 16-18 h). Bei unter diesen Bedingungen erzeugten Gradienten konnte keine Proteintrennung festgestellt werden. Vielmehr befand sich auf dem Gradienten eine milchig-trübe, gelbe Schicht (Auftragszone); am Boden des Röhrchens sedimentierte ein winziges gelbes Pellet. Dazwischen war der Gradient klar und farblos. (Abb. 7).

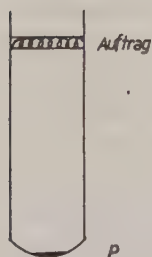


Abb. 7: Linearer Glyceringradient von 10 -30 % Glycerin in 40 mM Tricin/KOH, 0,1 % Et-SH, pH 7,5. Das Gradientenvolumen betrug 20 ml. Auf den Gradienten wurden 5 ml solubilisierter Etioplasten nach Zentrifugation bei 78.000 g aufgetragen und 16 h bei 70.000 g im Ausschwingrotor zentrifugiert.

Der Gradient wurde in 2 ml Portionen fraktioniert und damit eine Proteinbestimmung durchgeführt, deren Profil in Abb. 8 dargestellt ist.

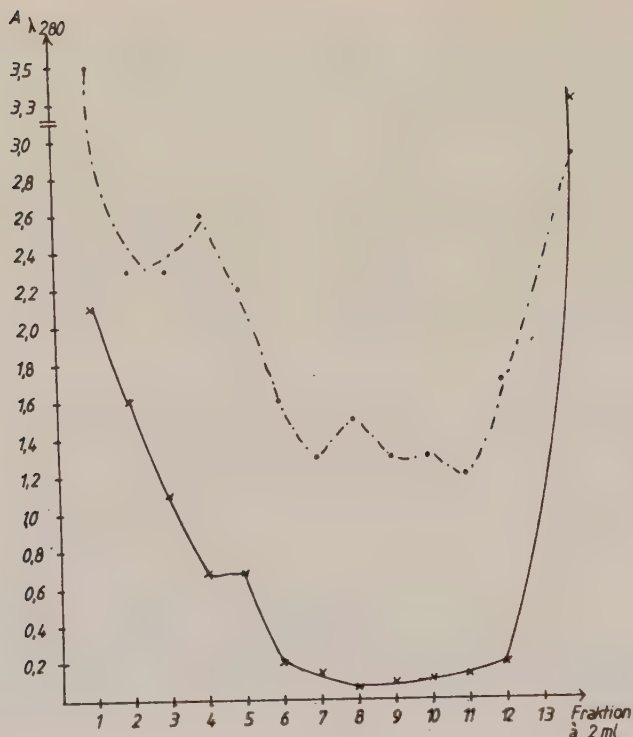


Abb. 8: Proteinelutionsprofil von 2 10-30 %

Glyceringradienten (s. Abb. 6). Die Gradienten wurden in 2 ml Portionen fraktioniert und die Absorption bei 280 nm bestimmt.

-----: Gradient aus Abb. 6

-.-.-.-: Identischer Gradient; das

Auftragsvolumen betrug jedoch 10 ml (78.000 g Überstand), die vor dem Auftrag auf 4,5 ml konzentriert wurden.

Es zeigte sich, daß die Hauptproteinmenge auf dem Gradienten und im Pellet vorhanden war, wogegen die Proteinmenge im Gradienten gering war. Aktivität konnte nur in geringstem Maße im Auftrag und im Pellet nachgewiesen werden. Es wurde nun versucht, durch Auftragen von konzentrierteren Proben (s. Tab.1, Pkt.3) eine Verbesserung der Versuchsbedingungen zu erreichen. Es zeigte sich jedoch im Prinzip das gleiche Bild (Abb. 8). Aufgrund

dieser Befunde wurde vermutet, daß das fehlende Detergenz im Gradienten ein Eindringen der gelösten Proteine in den Gradienten verhindert und die nicht gelösten Proteine pelletierten. Aus diesem Grunde wurden die Versuche wiederholt, wobei die Gradienten 0,1 % Brij W1 enthielten. Dadurch konnte eine wesentlich bessere Bandierung der Gradienten erreicht werden. Abb. 9 zeigt solch einen Gradienten.

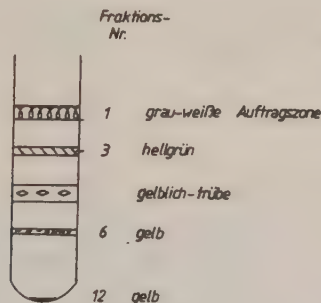


Abb. 9: Linearer Glyceringradient von 10 - 30 % Glycerin in 40 mM Tricin, 0,1 % Et-SH, 0,1 % Brij W1. Es wurden 6 ml solubilisierete Etioplasten nach einer Zentrifugation bei 50.000 g aufgetragen ($\hat{=}$ Enzymaktivität von 6,66 nmol Chl) und 16 h bei 100.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient in 2 ml Fraktionen aufgeteilt und die angegebenen Fraktionen auf Enzymaktivität getestet.

Im Enzymtest konnte Aktivität in Fraktion 6 (dünne, gelbe Bande) und im Pellet nachgewiesen werden. Die Ausbeute betrug dabei 7 %, bezogen auf die insgesamt aufgetragene Aktivität.

Mittels Dichtebestimmung des Gradienten konnte festgestellt werden, daß die Bande, die Aktivität zeigte, einer Dichte von 18 - 20 % Glycerin entsprach. Daraufhin wurde versucht, durch Stufengradienten und kürzere Zentrifugationsdauer eine bessere Anreicherung zu erzielen.

Mit einem Stufengradienten von 16/18/22 % und einer Zentrifugationsdauer von 14,5 h konnte zwar eine Bandierung erreicht werden, jedoch ließ sich keine Aktivität mehr nachweisen. Aus diesem Grunde wurden Gradienten mit einer Zentrifugationszeit von 3 h gefahren. Abb. 10 zeigt die beiden Gradienten im Vergleich.

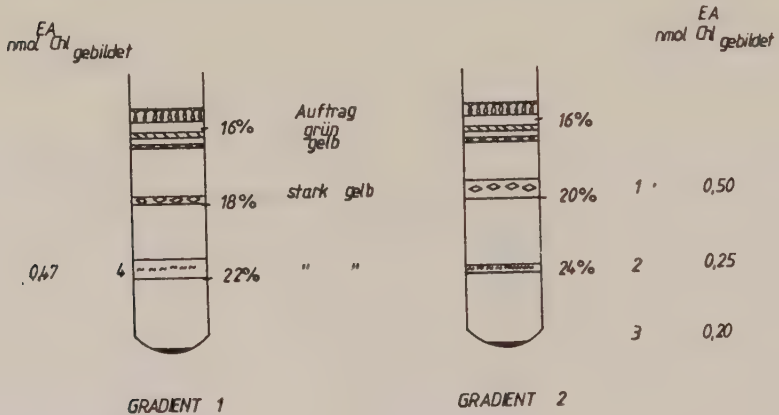


Abb.10: Glycerinstufengradienten zur Auftrennung der Proteine eines 50.000 g Überstandes von mit 0,1 % Brij W1 solubilisierten Etioplasten. Das Gradientenvolumen pro Stufe betrug 6 ml. Auf jeden Gradienten wurden 6 ml Überstand aufgetragen und 3 h bei 100.000 g zentrifugiert. Gradient 2 wurde in 2 ml Portionen fraktioniert und alle Fraktionen im Standardenzymtest (s. Tab. 6) auf Enzymaktivität getestet. (Aufgetragene Aktivität: 6,65 nmol; eluierte Aktivität 0,95 nmol).

Im 1. Gradienten bilden sich 2 gelbe Banden bei 18 % bzw. 22 %, wobei die Bande bei 22 % stärker ausgeprägt ist und eine Aktivität von .47 nmol gebildetem Chl zeigt. Im 2. Gradienten bildet sich bei 20 % Glycerin eine starke Bande mit einer Aktivität von 0.50 nmol gebildetem Chl, wogegen die Bande bei 24 % wesentlich geringer ausgeprägt ist und nur noch eine Aktivität von 0.25 nmol

Chl zeigt. Daraus kann man folgern, daß die Chlorophyll-Synthetase bei einer ca. 20 % igen Glycerinkonzentration des Gradienten auftritt. Gradient 2 wurde vollständig auf Aktivität durchgetestet. Außer den beiden oben genannten Banden ließ sich Aktivität nur mehr im P nachweisen, die Ausbeute an Enzymaktivität betrug 14 %, bezogen auf die aufgetragene EA.

Die Elektrophorese von Gradient 2 ist in Abb. 11 dargestellt. Daraus lassen sich keine Aussagen über die Verteilung des Enzyms ableiten, da in allen Fraktionen die gleichen Banden auftraten.

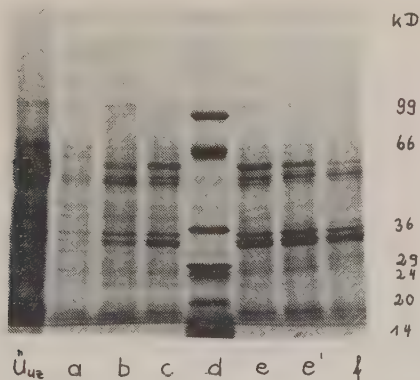


Abb. 11: SDS PAGE von mit 0,1 % Brij W1 solubilisierten Etioplastenmembranen nach Glyceringradientenzentrifugation. Bedingungen der Zentrifugation gemäß Abb.10. Spur a = Auftrag, b = grüngelbe Bande, c = Bande bei 20 % Glycerin, d = Molekulargewichtsstandard, e, e' = Bande bei 24 % Glycerin, f = Pellet der Zentrifugation

Durch die Zentrifugation im Vertikalrotor konnte zwar eine Bandierung erreicht, jedoch aufgrund des geringen

Auftragsvolumens keine Aktivität mehr nachgewiesen werden.

2. Ionenaustauschchromatographie

2.1. Kationenaustausch mit CM 52 Cellulose

Aufgrund vorliegender Informationen (Gronau 1983) über einen isoelektrischen Punkt von ca. pH 8,8 für die Chl-Synthetase wurde die Chromatographie über Kationenaustausch versucht. Bei einem pH von 7,5 müßte das Enzym an den Ionenaustauscher binden.

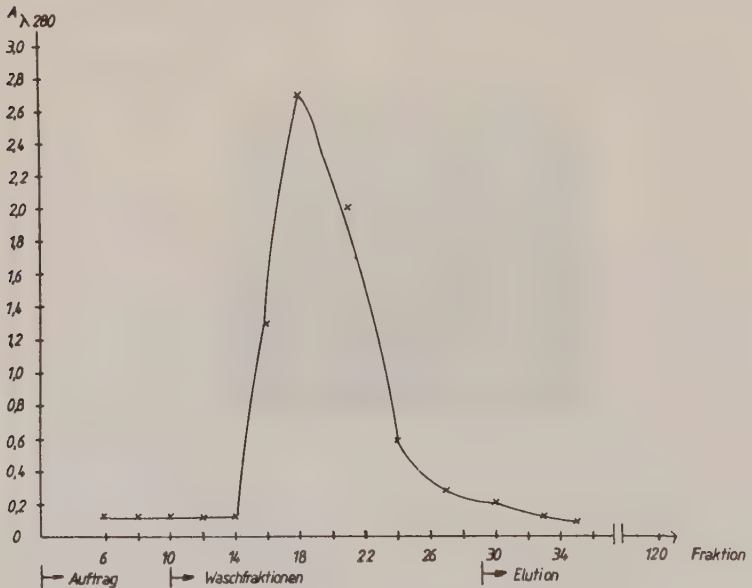


Abb. 12: Proteinelutionsprofil der CMC-Chromatographie bei pH 7,5.

Die Chromatographie erfolgte in 40 mM Tricin/KOH, 10 % Glycerin, 0,1 % Et-SH. Auftragsvolumen: 14 ml Eluat von Entsalzungssäule P-6DG. Die aufgetragene Enzymaktivität entsprach 7,4 nmol Chl. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0 - 500 mM NaCl.

Ab Fraktion 6 wurde die Probe aufgetragen, ab Fraktion 10 der Waschpuffer angeschlossen. Dabei verteilte sich die gelbe Farbe der Auftragslösung sehr schnell über die ganze Säule. Noch bevor der Elutionsgradient angelegt wurde (Fraktion 29) waren die gelben Fraktionen bereits wieder von der Säule eluiert. Bei einer anschließenden Proteinbestimmung zeigte sich, daß sich die gesamte Proteinmenge im Durchlauf befand. Der Test auf Enzymaktivität zeigte, daß die aufgetragene Aktivität zu 100 % in den Fraktionen 16-22 wiedergefunden werden konnte. Unter den gegebenen Bedingungen erfolgt somit keine Bindung an den Kationenaustauscher.

Versuche bei pH 6,5 führten zu einer identischen Protein-elution, bei Bindungsversuchen mit pH 8,2 mit oder ohne Detergenz fand sich das Protein ebenfalls nur im Durchlauf. Von einer Erniedrigung des pH-Wertes unter pH 6,5 wurde aufgrund der dann auftretenden Aktivitätsprobleme (s. C.III.1) abgesehen.

2.2. Anionenaustausch mit DE 52 - Cellulose

Da sich bei der Chromatographie mit CM-Cellulose gezeigt hatte, daß die Synthetase bei pH 7,5 nicht an den Kationenaustauscher bindet, wurde eine Anionenaustauschchromatographie unter verschiedenen Bedingungen versucht.

Zunächst wurden zwei Chromatographien verglichen, die a. mit Standardpuffer bzw. b. mit Standardpuffer + 0,1 % Brij W1 durchgeführt wurden. In beiden Fällen wurde das solubilisierete Enzym in 0,1 % Brij W1 Lsg. aufgetragen (d.h. überschüssiges Detergenz wurde nach der Solubilisierung nicht entfernt). Die gesamte gelbe Farbe der Auftragssuspension wurde in beiden Fällen an die Säule gebunden. Da im Gegensatz zum Kationenaustauscher weder im Durchlauf noch in den Waschfraktionen Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde davon ausgegangen, daß das Enzym an den Anionenaustauscher bindet. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0 - 500 mM KCl bzw. NaCl im Standardpuffer für Säule I bzw. im Standardpuffer +

0,1 % Brij W1 bei Säule II. Falls das Enzym in dem Bereich bis zu 100 mM Salzkonzentration eluiert würde, wäre aufgrund der Vorversuche eine nachweisbare Aktivität im Eluat zu erwarten. Die Hauptproteinmenge wurde im Bereich zwischen 50 und 100 mM Salz eluiert. Es ergaben sich 2 Proteinmaxima (s. Abb. 13), die zugleich stark gelb gefärbt waren. Ein weiterer Proteinpeak ergab sich bei Elution mit 3 M NaCl. Es konnte jedoch bei beiden Peaks keine Aktivität im Eluat nachgewiesen werden.

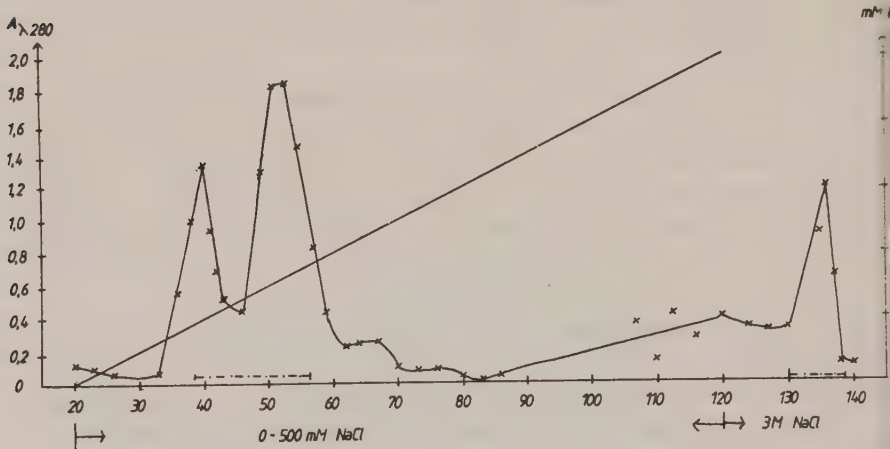


Abb. 13: Proteinelutionsprofil nach DE 52 - Säulenchromatographie.

Auf die mit 40 mM Tricin, 10 % Glycerin, 0,1 % Et-SH, 0,1 % Brij W1 equilibrierte wurden 13 ml solubilisierte Etioplasten ($U_{78.000g}$) aufgetragen (Enzymaktivität = 22,5 nmol Chl) und mit einem Gradienten von 0-500 mM NaCl in obigem Puffer eluiert. Fraktionsvolumen = 2,5 ml.

: Im Standardenzymtest auf Enzymaktivität getestete Fraktionen.

Ein weiterer Aufreinigungsversuch wurde mit Equilibrierpuffer, der zusätzlich zum Standardpuffer 50 mM Prolin

enthielt, durchgeführt. Der Elutionspuffer hatte dieselbe Zusammensetzung, enthielt jedoch einen Gradienten von 0 - 500 mM LiCl und 0,1 % Brij W1. Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche (s.C.III.5.3.) wurde von Prolin ein schützender Effekt auf die Synthetase erwartet. Im Eluat konnte keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden. Möglicherweise findet durch den Ionenaustauscher eine Entfernung des Prolins aus dem Puffer-Proteingemisch statt. Dies wurde nicht näher untersucht.

Auch Chlid und Pheid im Equilibrier-, Wasch- und Elutionspuffer konnte eine Inaktivierung des Enzyms nicht verhindern. Die Erniedrigung der Ionenkonzentration im Equilibrierpuffer (40 mM - 10 mM) brachte keine Verbesserung.

3. Molekularsiebchromatographie

Nachdem die Ionenaustauschchromatographie unter den gegebenen Voraussetzungen immer zu einer Inaktivierung des Proteins führte, wurde versucht, die Proteine mittels Molekularsieb voneinander zu trennen. Da das Probevolumen bei der Molekularsiebchromatographie nicht größer als 1-5 % des Säulenvolumens sein soll, mußte der Überstand aus der UZ-Zentrifugation konzentriert werden. Erst diese gem. B.II.12. konzentrierte tiefgelbe Lösung wurde auf die Molekularsiebsäulen aufgetragen.

3.1. Molekularsiebchromatographie mit Sephadex G 100

Zunächst wurde die Auftrennung mit Sephadex G 100 versucht. Abb. 14 zeigt das Proteinprofil der Auftrennung. Daraus ist zu ersehen, daß die Hauptproteinmenge in einem relativ engen Bereich eluiert wird (Frkt. 14-18), während andeutungsweise noch Protein in einem späteren Bereich auftritt. Fraktionen 14 - 18 waren dunkelgelb, Fraktionen 19 und 20 schwach gelb gefärbt; offensichtlich sind das Vorkommen von Protein und die Gelbfärbung der Lösung miteinander korreliert. Fraktionen 15 - 17 sowie 31 - 36 wurden auf Enzymaktivität getestet. Dabei zeigte sich,

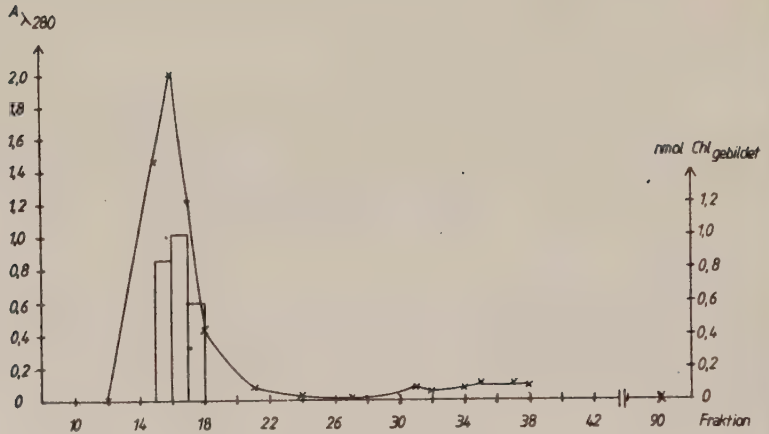


Abb. 14: Elutionsprofil von Protein und Enzymaktivität der Chlorophyll-Synthetase bei der Sephadex G 100 - Chromatographie.

Die Säule wurde mit Standardpuffer equilibriert. Auftrag: 10 ml solubilisierte Etioplasten wurden 45 Min. bei 78.000 g zentrifugiert, der Überstand entsalzt, auf 5 ml konzentriert und davon 4,5 ml auf die Säule aufgetragen (Enzymaktivität = 3,96 nmol Chl). Die Elution erfolgte mit Standardpuffer. Fraktionen 15 - 17 sowie 31 - 36 wurden auf Enzymaktivität getestet. 70 % der aufgetragenen Aktivität wurde in Fraktion 15 - 17 wiedergefunden.

daß 70 % der insgesamt aufgetragenen Aktivität in den Fraktionen 15 - 17 wiedergefunden werden konnten, während in Fraktionen 31 - 36 keine Aktivität nachgewiesen wurde. Offensichtlich wird die Enzymaktivität ebenfalls mit der Hauptproteinmenge eluiert. Das frühe Auftreten des Proteinpeaks im Ausschlußvolumen legt den Schluß nahe,

daß die Proteine aggregiert vorliegen und die Aggregatgröße die Porengröße der Gelmatrix überschreitet, sodaß die Proteine nicht in die Poren eindringen können und folglich auch kein Aufreinigungseffekt erzielt wird. Da jedoch die Ausbeute 70 % der aufgetragenen Enzymaktivität beträgt und somit die Methode als solche nicht zu einer vollständigen Inaktivierung des Proteins führt, wurde eine Auftrennung mit Sephadex G 200 versucht.

3.2. Molekularsiebchromatographie mit Sephadex G 200

Der Trennbereich von Sephadex G 200 liegt zwischen MG 5.000 und 250.000, d.h. Partikel mit Molekulargewichten in diesem Bereich dringen in die Matrix ein und werden voneinander getrennt. Abb.15 zeigt das Proteinprofil dieser Chromatographie; dabei zeigt sich im Prinzip das gleiche Bild wie beim Aufreinigungsversuch mit Sephadex G 100; die Fraktionen, die am stärksten gefärbt sind, weisen den höchsten Proteingehalt auf und enthalten die Hauptenzymaktivität, was den Schluß zuläßt, daß eine Aufreinigung mit Sephadex G 200 nicht möglich ist, da die Proteine ausgeschlossen werden. Die Ausbeute an wiedergefundener Enzymaktivität beträgt wiederum zwischen 60 und 70 %.

3.3. Molekularsiebchromatographie mit Biogel A.

Ebenfalls in Abb. 15 ist das Proteinprofil des Auftrennungsversuches mit Biogel A dargestellt. Das Ergebnis entspricht dem von Punkt 3.1. und 3.2.. Proteinmaxima, gelbe Farbe des Eluats und Hauptenzymaktivität finden sich in denselben Fraktionen im Ausschlußvolumen. Die Ausbeute beläuft sich ebenfalls auf ca. 60 %.

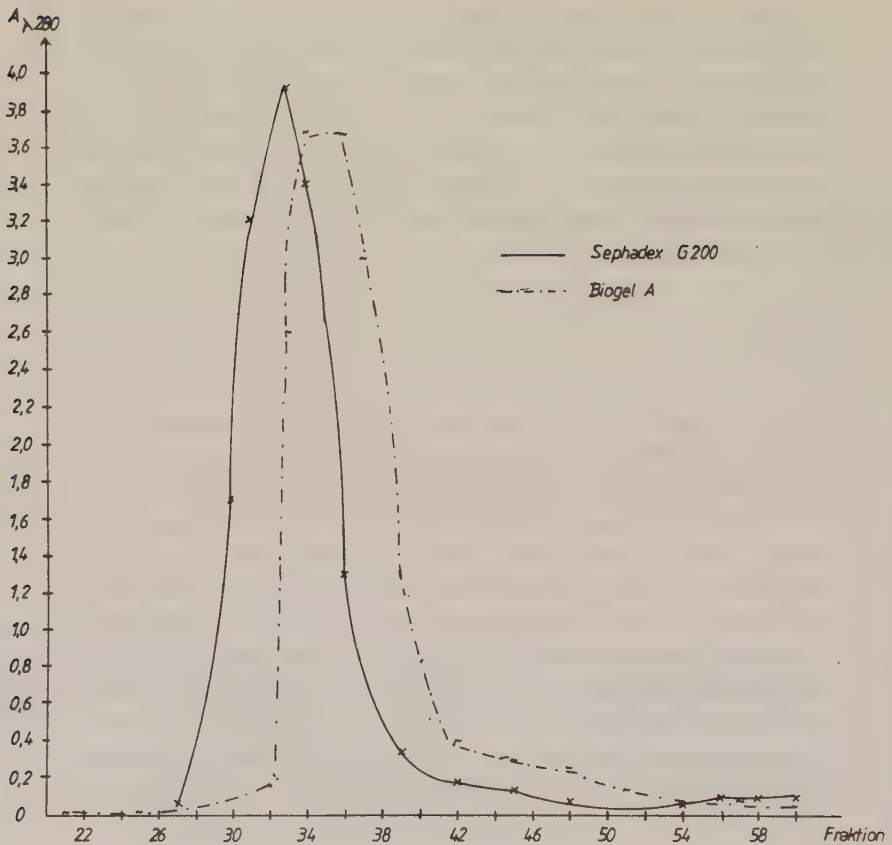


Abb. 15: Proteinelutionsprofil der Molekularsiebchromatographie mit Sephadex G 200 (—) und Biogel A (---).

Auf jede, mit Standardpuffer equilibrierte Säule wurden 3,3 ml solubilisierte, 45 Min. bei 78.000 g zentrifugierte, entsalzte und konzentrierte Etioplastensuspension aufgetragen, die einer Enzymaktivität von 9 nmol entsprachen. Bei Sephadex G 200 konnten 66 % der aufgetragenen Aktivität in den Fraktionen 31 - 36 gefunden werden, bei Biogel A 60 % in den Fraktionen 33 - 44. Fraktionsvolumen = 2,5 ml.

3.4. Molekularsiebchromatographie mit Sephacryl S300.
 Ein weiteres, zur Gelfiltration verwendetes Material war Sephacryl S 300. Abb. 16 zeigt das Elutions- und Aktivitätsprofil dieses Aufreinigungsversuches. Dabei zeigt sich, wie bei allen anderen Materialien, das gleiche Bild. Die Hauptproteinmenge wird in einem scharfen Peak im Ausschlußvolumen wieder von der Säule eluiert. Die Hauptaktivität findet sich in der Hauptproteinfraktion, d.h. eine Auftrennung ist nicht erfolgt. Die Ausbeute an Enzymaktivität betrug ca. 50 %.

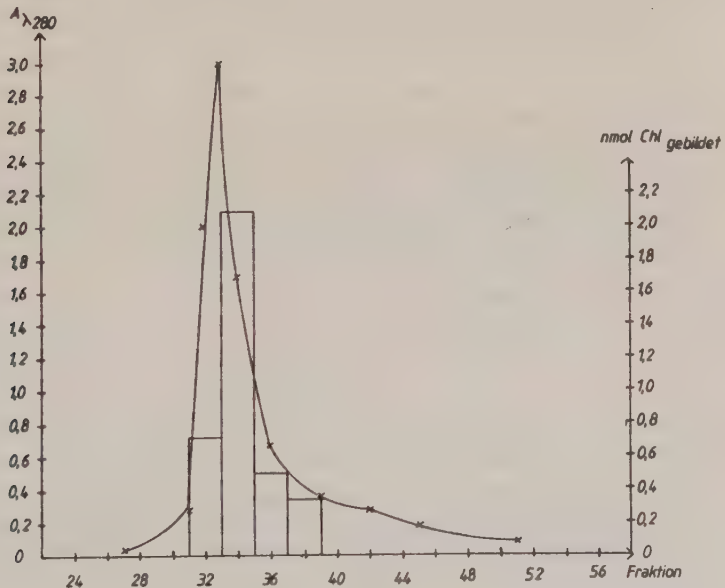


Abb. 16: Protein- und Aktivitätselutionsprofil der Molekularsiebchromatographie mit Sephacryl S 300. Die Säule wurde mit Standardpuffer equilibriert. Auftrag: 9 ml solubilisierte Etioplasten wurden 45 Min. bei 78.000 g zentrifugiert, entsalzt, und auf 3 ml konzentriert (Enzymaktivität = 7,50 nmol Chl). 50 % der aufgetragenen Aktivität wurden in den Fraktionen 31 - 39 wiedergefunden. Fraktionsvolumen = 2,7 ml.

Die Durchführung derselben Chromatographie mit 0,1 % Brij W1 im Standardpuffer führte ebenfalls zu keiner Auftrennung sondern lediglich zu einer Verbreiterung des Elutionspeaks, wobei die eluierte Aktivität in den getesteten Fraktionen nur mehr 12 % der aufgetragenen Aktivität betrug.

4. Calciumphosphat-Chromatographie (Brushite)

Eine weitere Methode zur Aufreinigung von Proteinen ist die Chromatographie mit Brushite. Erfolgreich angewendet wird sie bei der Isolation und Reinigung von Phytochrom (Thümmler 1984).

Vorversuche deuteten darauf hin, daß eine maximale Bindung des Enzyms an die Matrix bei einer Kalium-Phosphat-Puffer-Konzentration von 30 mM stattfindet, sodaß eine Säulenchromatographie durchgeführt wurde, bei der die Bindung mit dieser Konzentration erfolgte.

$A_{\lambda 280}$

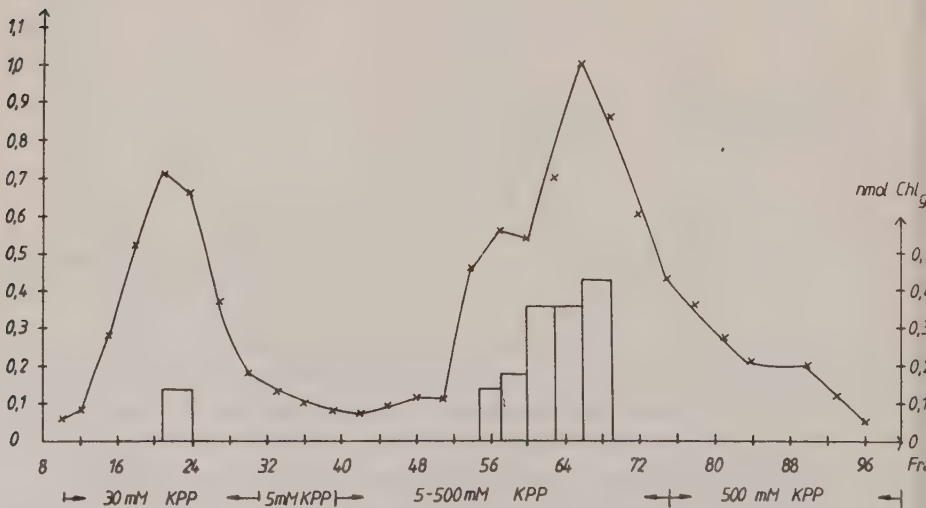


Abb. 17: Elutionsdiagramm von Protein und Enzymaktivität nach Auftrennung des 78.000 g Überstandes von mit 0,1 % Brij W 1 solubilisierten Etioplasten mittels Brushite-Chromatographie.

Die aufgetragene Enzymaktivität betrug 7,7 nmol Chl. Davon wurden 20 % mit einem Kalium-Phosphatpuffergradienten (pH 7,5) von 5 - 500 mM im Bereich von ca. 300 - 350 mM eluiert. Fraktionsvolumen = 3 ml.

Aus Abb. 17 ist ersichtlich, daß nicht alles Protein an das Säulenmaterial gebunden hat und durch Waschen mit 30 mM KPP pH 7,5 bereits teilweise wieder von der Säule gelöst wird. In diesen Waschfraktionen konnte auch Enzymaktivität der Chl-Synthetase nachgewiesen werden. Durch die Elution mit einem Kalium-Phosphatpuffer-Gradienten von 30 - 500 mM konnte Protein eluiert werden, hauptsächlich in einem Bereich von 200 - 400 mM. Auch hier ging die Gelbfärbung einher mit dem Proteingehalt. Nur in gelb gefärbten Fraktionen konnte Protein nachgewiesen werden, nicht jedoch in ungefärbten Fraktionen; die gelb gefärbten, proteinhaltigen Fraktionen wurden auf Enzymaktivität getestet. Es zeigte sich, daß die Fraktionen, die am meisten Protein enthielten, auch die höchste Enzymaktivität zeigten.

5. Hydroxylapatit-Chromatographie

Ein weiteres, in der Proteinaufreinigung angewandtes System ist die Hydroxylapatit-Chromatographie, wobei es sich um ein modifiziertes Calciumphosphat handelt (Tiselius 1956, Main et al. 1959, Siegelman et al. 1965, Spencer 1978, Spencer et al. 1978).

Die Bindung von Proteinen an Hydroxylapatit erfolgt nach Bernardi (1973) in der Regel in einem niedermolekularen Phosphatpuffer. Elution kann sowohl durch Anionen (in erster Linie PO_4^{2-}) oder durch Kationen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) erreicht werden. Dabei hängt das Elutionsverhalten des Proteins maßgeblich von dessen IEP ab (Bernardi 1973, Gorbunoff 1984), d.h. basische Proteine zeigen ein anderes Elutionsverhalten als neutrale bzw. saure.

Zunächst wurde die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase in 100 mM KPP, pH 7,8 verglichen mit dem gleichen Puffer, der 1 mM CaCl_2 enthielt. Mit nur 1 mM CaCl_2 werden gemäß

Bernardi (1973) basische Proteine eluiert, mit Kalium-Phosphatpuffer pH 7,8 werden Proteine generell bei niedrigeren Molaritäten eluiert als bei pH 6,8, einem bei der Hydroxylapatit-Chromatographie häufig angewendeten pH-Wert. Die Synthetase zeigte bei 1 stündiger Inkubation mit 100 mM KPP, pH 7,8 volle Aktivität verglichen mit 40 mM Tricin, pH 7,5; bei Inkubation mit 1 mM CaCl_2 zeigte sich im anschließenden Enzymtest bereits eine Abnahme der Aktivität um 45 %.

Tab. 17: Vergleich der Enzymaktivität bei Elution mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP) mit und ohne 1mM CaCl_2

	100 mM KPP	100 mM KPP + 1 mM CaCl_2
nmol Chl / 15 Min.	1,77	0,97

Beim Auftrag in 10 mM KPP, pH 7,5 und Elution mit 100 mM KPP pH 7,8 zeigte sich, daß die Aktivität nicht vollständig gebunden wurde, sondern sich ein Teil davon im Durchlauf- und Waschvolumen befand (40 %), d.h. nur knapp die Hälfte der Aktivität band an die Säule (s. Tab. 18).

Tab. 18: Bindung und Elution von Protein an Hydroxylapatit mit und ohne Detergenz im Puffer. Je 1 ml in 10 mM KPP, 10 % Glycerin, 0,1 % Et-SH, pH 7,5 mit 0,1 % Brij W 1 solubilisierter und 45 Min. bei 78.000 g zentrifugierter Etioplasten wird auf die Säule aufgetragen und mit dem angegebenen Puffer eluiert. Durchlauf- und Waschvolumen / Säule: 4 ml Elutionsvolumen: 2,5 ml

Säule	ohne Detergenz	mit Detergenz
Equilibrationspuffer:	10 mM KPP, pH 7,5	dito + 0,05 % Brij W1
Elutionspuffer:	100 mM KPP, pH 7,8	dito + 0,1 % Brij W1
Enzymaktivität und Proteingehalt		
DL + W:	40 % (0,50 mg)	65 % (0,61 mg)
Elution:	60 % (0,65 mg)	35 % (0,92 mg)
100 % Enzymaktivität =	0,72 nmol Chl	0,44 nmol Chl
DL + W = Durchlauf- und Waschfraktion		

Bindung und Elution unter identischen Bedingungen, jedoch mit 0,05 % Brij W1 im Equilibrier- und Waschpuffer bzw. 0,1 % Brij W1 im Elutionspuffer zeigte, daß sich das Verhältnis von gebundener Aktivität zu nicht gebundener Aktivität noch verschlechterte: 65 % der Aktivität wurden im Durchlauf gefunden. Außerdem war hier die Gesamtaktivität insgesamt geringer (61 %) als bei Elution ohne Detergenz. Dies dürfte auf eine Inaktivierung durch das Detergenz zurückzuführen sein und nicht etwa auf eine geringere Elution von Enzym, da die eluierte Proteinmenge bei Elution mit Detergenz sogar höher ist, als bei Elution ohne Detergenz (Tab. 18). Das Verhältnis von gebundener zu nichtgebundener Enzymaktivität konnte durch die Anwendung von Tricinpuffer als Equilibrierpuffer etwas verbessert werden. Dabei zeigte sich deutlich eine zunehmende Bindung bei abnehmender Molarität des Puffers. Während sich bei 20 mM Tricin die gebundene Aktivität auf 60 - 70 % der wiedergefundenen Aktivität belief, konnte bei 80 mM Tricin die Aktivität ausschließlich im Durchlauf- und Waschvolumen wiedergefunden werden. Die Elution erfolgte immer mit 100 mM KPP, pH 7,8, 10 % Glycerin, 0,1 % Et-SH.

Tab. 19: Bindung an Hydroxylapatit in Tricinpuffer in Abhängigkeit von der Molarität des Puffers.

Je 1 ml in 20 mM, 40 mM, 60 mM und 80 mM Tricinpuffer suspendierte Etioplasten wurden der Standardsolubilisierung unterworfen und auf die mit dem gleichen Puffer equilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 100 mM KPP, pH 7,8.

Pufferkonzentration (mM)	Aktivität wiedergefunden (nmol)	DL + W %	Eluat %
20 mM	.41	36	64
40 mM	.44	40	60
60 mM	.53	45	55
80 mM	.44	100	0
Applizierte Aktivität/Säule: .88nmol → Ausbeute = 50 % DL + W = Durchlauf- und Waschfraktion			

Bei diesen Versuchen ergibt sich eine gute Verträglichkeit der Synthetase gegenüber Hydroxylapatit und den dabei angewandten Bedingungen. Im Gegensatz zur Anionenaustauschchromatographie, bei der keine Aktivität eluiert werden konnte, findet sich bei den hier durchgeführten Versuchen eine Ausbeute an Enzymaktivität um die 50 % bezogen auf die applizierte Aktivität.

5.1. Anwendung von Stufengradienten

Aus den Vorversuchen zur Bindung und Elution der Enzymaktivität der Chlorophyll-Synthetase an Hydroxylapatit war hervorgegangen, daß gebundene Aktivität mit 100 mM KPP (pH 7,8) von der Säule eluiert werden konnte. Die Stufengradienten sollten dazu dienen, den Bereich, in dem die Aktivität eluiert wird, einzuengen. Anschließende elektrophoretische Auftrennung der Proteine in den einzelnen Fraktionen sollte Aufschluß über die Proteinzusammensetzung bringen.

Bei der Elution mit 10 mM, 30 mM, 50 mM, 70 mM, 100 mM, 200 mM und 500 mM KPP zeigte sich zunächst eine unterschiedliche Farbintensität der einzelnen Fraktionen. Intensiv gelb gefärbte Fraktionen wurden bei 30 mM KPP, pH 7,8 sowie bei 500 mM KPP eluiert. Dazwischen waren die Fraktionen bei allen untersuchten Pufferkonzentrationen nur leicht gelblich gefärbt. Es wurde bei allen Konzentrationen mit soviel Puffer eluiert, daß vor Anlegen der nächst höheren Konzentration eine farblose, klare Fraktion vorlag. So war gewährleistet, daß die Eluate der einzelnen Konzentrationen tatsächlich voneinander getrennt waren. Beim Test auf Enzymaktivität zeigte sich, daß die Aktivität bei relativ geringen Konzentrationen eluiert wurde. Mit 10 mM KPP pH 7,8 konnte noch keine Synthetaseaktivität eluiert werden. Hauptsächlich wurde sie bei 30 mM, 50 und 70 mM KPP, pH 7,8 eluiert (s. Tab. 20).

Tab. 20: Proteinelution mit Kalium-Phosphatstufengradienten bei der Hydroxylapatit-Chromatographie. Verteilung der Enzymaktivität auf die einzelnen Fraktionen bei 3 verschiedenen Chromatographien. Aufgetragene Enzymaktivität = 100 %).

	Säule A	Säule B	Säule C
Aufgetragene Aktivität (nmol Chl)	3,19	1,16	3,30
Eluierte Aktivität (nmol Chl)			
30 mM KPP:	0,33	0	0,23
50 mM KPP	0,20	0,52	0
70 mM KPP	0,20	0	0
100mM KPP	0	0	0
200 mM KPP	-	0	0
Ausbeute:	23 %	45 %	7 %
Die Durchführung erfolgte gemäß Tab. 2 (Säule 2, 3, 4).			

Eine qualitative Untersuchung der Proteinzusammensetzung von Säule A mittels SDS-Gelelektrophorese (Abb.18) zeigt deutlich eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung der einzelnen Fraktionen.

Eine Vielzahl von Proteinen wurde im niedermolaren Elutionsbereich zwischen 30 und 70 mM KPP von der Säule gelöst. Dagegen zeigte sich bei 100 mM KPP, pH 7,8 eine relativ selektive Elution mit deutlich verminderter Anzahl der Banden. Bei der dabei auftretenden Hauptbande dürfte es sich um die Protochlorophyllidreduktase handeln, deren Molekulargewicht bei 35.000 - 37.000 liegt (Apel 1981, Griffiths & Beer 1982, Ryberg und Sundquist 1982 a) und die bei der Isolierung aus saponinhaltigen Haferetioplasten als Doppelbande auftritt (Röper et al. 1983). Rückschlüsse auf die Verteilung der Chlorophyllsynthetase sind nur insofern möglich, als unter diesen Bedingungen bei der Elution mit 100 mM KPP, pH 7,8 keine Chlorophyllsynthetaseaktivität auftritt, d.h., daß Chlorophyllsynthetase und PChlid-Reduktase offensichtlich in

unterschiedlichen Fraktionen angereichert werden.

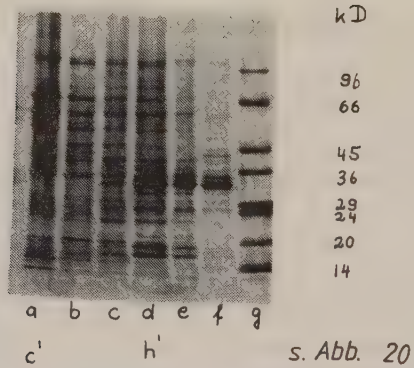


Abb. 18: SDS-PAGE von in 0,1 % Brij W1 solubilisierten Etioplasten nach Hydroxylapatit-Chromatographie (Säule A, Tab. 20).

Spur a = 30 mM KPP, b = 30/50 mM KPP Mischfraktion, c = 50 mM KPP, d = 70 mM KPP, e = 70/100 mM KPP Mischfraktion, f = 100 mM KPP, g = Molekulargewichtsstandard

Aktivität in den Fraktionen: a = 0,33 nmol

c = 0,20 nmol

d = 0,20 nmol

5.2. Lineare Gradienten

Aufgrund der durchgeführten Auftrennungsversuche mit Stufengradienten war keine eindeutige Zuordnung bezüglich der Enzymaktivität zu einer definierten Konzentration des Elutionspuffers möglich. Es konnte lediglich gezeigt werden, daß die Elution der Aktivität des Enzyms mit geringen molaren Konzentrationen des Puffers erreicht wird. Da jedoch die Aktivität über einen relativ weiten Bereich (ca. 30 - 70 mM) verteilt auftrat, wurde

versucht, diesen Bereich mittels Elution durch lineare Gradienten weiter einzugrenzen. Für eine genaue Beschreibung der durchgeführten Chromatographien siehe Punkt B.III.5.4.

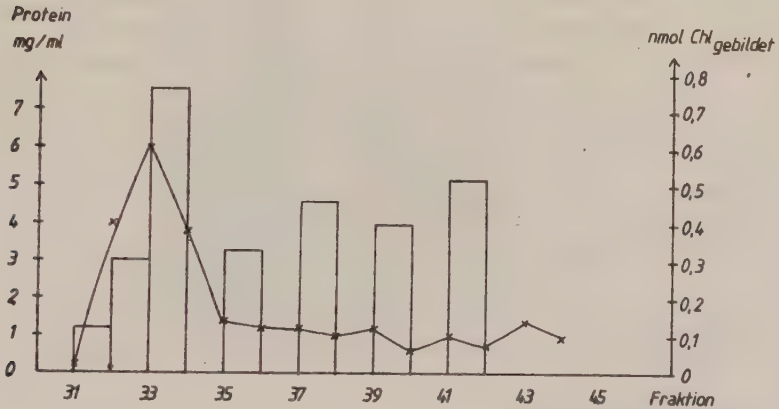


Abb. 19: Elutionsdiagramm von Protein und Enzymaktivität nach Auftrennung des 50.000 g Überstandes von mit 0,1 % Brij W1 solubilisierten Etioplasten mittels Hydroxylapatitchromatographie. Die aufgetragene Enzymaktivität betrug 3,75 nmol Chl (Säule B, Tab. 21). Diese wurde zu 100 % mit einem Gradienten von 10–200 mM KPP pH 7,8 eluiert. Fraktion 31 – 45 = 10 – 60 mM KPP. Fraktionsvolumen = 3 ml. Proteinbestimmung gemäß Lowry.

Abb. 19 zeigt das Protein- und Enzymaktivitätselutionsdiagramm einer Hydroxylapatitsäule mit einem linearen KPP-Gradienten. Daraus ist ersichtlich, daß die Hauptproteinmenge relativ früh (22 mM) (Gradientenanfang = Fraktion 31, 10mM KPP); damit einher geht ebenfalls das Aktivitätsmaximum. Weitere Aktivität wurde bis Fraktion 44 eluiert. Fraktion 31 – 45 entsprechen dabei einem Gradienten von ca. 10 – 60 mM KPP, d.h., die Aktivität wird entsprechend den Stufengradienten relativ früh eluiert. Die spezifische Aktivität im Bereich von Fraktion 41 war dabei 4fach höher als im Bereich der Fraktion 33.

Tab. 21: Elution der Aktivität mit Kaliumphosphatpuffer (Lineare Gradienten) bei der Hydroxylapatit-Chromatographie. Verteilung der Enzymaktivität auf die einzelnen Elutionsbereiche bei 4 verschiedenen Chromatographien (Tab.3). Aufgetragene Aktivität = 100 %).

Säule	A	B	C	D
Aufgetragene Aktivität (nmol Chl)	9,92	3,75	2,1	16,4
Eluierte Aktivität (nmol Chl)	6,12	4,22	0,84	2,15
Ausbeute (%)	61	112	40	13
Elutionsbereich (mM KPP)	50	22	28	30-50

Wie aus Tab. 21 hervorgeht, war dies bei allen Hydroxylapatitchromatographien der Fall.

In Abb. 20 ist die SDS-PAGE der Chromatographie aus Abb. 19 dargestellt, die zu ähnlichen Proteinmustern wie die Auftrennung der Stufengradientenchromatographie führte.. So wurde in beiden Fällen Proteine aus dem Molekulargewichtsbereich zwischen 40 und 66 kD bei niederen KPP-Konzentrationen eluiert (Spur c' und e, Abb. 20, Spur c' Abb. 18), Proteine mit Molekulargewichten zwischen 29 und 36 kD finden sich dagegen bei einer KPP-Konzentration von 60 - 70 mM (Spuren g und h Abb. 20, Spur h' bei Abb. 18).

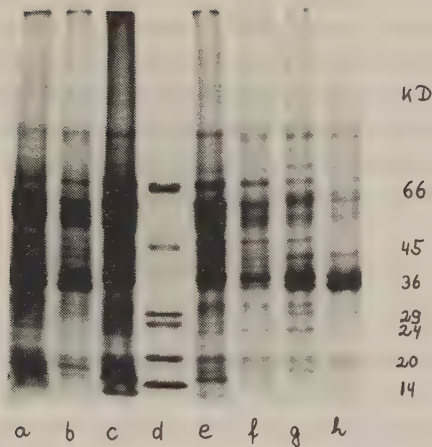


Abb. 20: SDS-PAGE von mit 0,1 % Brij W1 solubilisierten Etioplasten nach Hydroxylapatitchromatographie. Die Elution erfolgte dabei mit einem linearen Gradienten von KPP, pH 7,8 von 10–200 mM.

a = Nichtsolubilisierter Etioplastenmembranen
 b = Solubilisierter Etioplastenmembranen
 c = Fraktion 33 gem. Abb. 19 (22mM KPP)
 d = Molekulargewichtsstandard
 e = Fraktion 35, f = Fraktion 37, g = Fraktion 39, h = Fraktion 41 gem. Abb. 19

5.3. Chromatographie mit trockenem Hydroxylapatit

Die Versuche zur Aufreinigung des Enzyms mit trockenem Hydroxylapatit wurden unter dem Aspekt durchgeführt, daß unter Umständen die Chlorophyll-Synthetase die Säule ungebunden passiert, während andere Proteine daran binden oder daß der umgekehrte Fall eintreten würde. In jedem Falle sollte dann eine partielle Anreicherung erreicht

werden können. Die Ausbeute an Enzymaktivität belief sich im Durchschnitt auf 50 %, bezogen auf die aufgetragene Aktivität. Die Verteilung dieser Aktivität zwischen der Durchlauf- und gebundener Aktivität war jedoch nicht einheitlich. In der Durchlauf- und gebundener Aktivität wurden zwischen 100 und 40 % der aufgetragenen Aktivität gefunden. Die Bindung an trockenen Hydroxylapatit war demnach von Aufarbeitung zu Aufarbeitung unterschiedlich, sodaß auf weitere Versuche verzichtet wurde.

6. Hydrophobe Chromatographie und Affinitätschromatographie

6.1. Hydrophobe Chromatographie mit Octyl-Sepharose

Bei der Chromatographie von solubilisierten Etioplastenmembranen mit Octyl-Sepharose zeigte sich, daß offensichtlich eine starke Bindung zwischen Gelmatrix und Proteinen erfolgt. Die bei hydrophober Chromatographie übliche Elution mit einem Gradienten von 0 - 50 % Ethylenglykol führte zu keiner Proteinelution. Auch die Anwendung von 100 % Ethylenglykol führte zu keinem Erfolg. Erst bei Anwendung von 2 % Brij W1 in Standardpuffer konnte die Elution von Protein erreicht werden. Aufgrund der Empfindlichkeit der Chlorophyll-Synthetase gegenüber einer Detergenzkonzentration in dieser Größenordnung wurde auf weitere Versuche verzichtet.

6.2. Affi-Gel 10 - Chromatographie

Zunächst wurde versucht, Chlid oder Pheid als Liganden an das Material zu koppeln. Während Chlid nicht an das Material koppelte (wurde beim Equilibrieren der Säule entfernt) band Pheid an das Affi-Gel (braun-grüne Färbung). Die auf eine Säule mit 1 ml Bettvolumen aufgetragene Enzymaktivität (0,71 nmol Chl) wurde zu 55 % im Durchlauf- und Waschvolumen der Säule wiedergefunden. Durch Elution mit Standardpuffer mit $1,5 \mu\text{M}$ Chlid konnte keine Aktivität detektiert werden.

IV. Untersuchungen zum Syntheseort der Chl-Synthetase

Plastiden besitzen eine eigene DNA sowie einen eigenen Apparat zur Proteinsynthese. Aber nur ca. 10 % der Plastidenproteine sind plastidenkodiert und werden auch im Plastiden in den 70 S Ribosomen translatiert. Die restlichen Proteine werden im Kern kodiert und im Cytoplasma in den 80 S Ribosomen synthetisiert (Harpster & Apel 1985). Erst dann erfolgt der Transport in die Plastiden. Meist werden im Cytoplasma größere Vorstufen erzeugt, die während oder nach dem Transport in die Plastiden prozessiert werden und dann als "reife" Proteine ihre Funktion in den Plastiden übernehmen. Gut untersuchte Beispiele hierfür sind das "light-harvesting chlorophyll a/b protein" (LHCP) und die kleine Untereinheit der Ribulosebisphosphatcarboxylase (Ellis 1981, Harpster & Apel 1985, Pfisterer et al. 1982). Das Zusammenspiel von cytoplasmatischen und plastidären Proteinen ist essentiell für die Funktionsfähigkeit des Plastiden.

Feierabend und Mikus (1977) beschreiben eine Methode, mit der sie Keimlinge von verschiedenen Getreidearten erhalten, die keine Plastidenribosomen mehr bilden. Proteine, die im Plastiden kodiert sind, können somit nicht mehr translatiert werden, die Plastidenproteinsynthese ist damit ausgeschaltet. Proteine, die vorhanden sind, müssen im Kern oder in den Mitochondrien kodiert sein.

Man erhält diese Keimlinge, wenn man die Pflanzen bei erhöhter Temperatur anzieht. Für Roggen und Hafer liegt diese "nichtpermissive" Temperatur bei 32 ° C, für Gerste bei 33 ° C und für Weizen bei 34 ° C (Feierabend 1979). Der Verlust an Plastidenribosomen tritt sowohl bei der Anzucht der Pflanzen im Licht als auch im Dunkeln auf (Feierabend & Schrader-Reichhardt, 1976). Für die unter diesen Bedingungen im Licht angezogenen Pflanzen ist charakteristisch, daß sie kein Chlorophyll enthalten, mit Ausnahme der Spitzen der Primärblätter, die noch 70 S

Ribosomen enthalten (Rademacher & Feierabend 1976). Feierabend (1977) konnte nachweisen, daß dieser Mangel an Chlorophyll nicht auf einer Abwesenheit der Enzyme, die von Ala zum PChlid führen, beruht. Dies bedeutet, daß diese Enzyme in den 70 S ribosomenfreien Pflanzen vorhanden sind. Auch die Anwesenheit der PChlid-Reduktase, die die Umwandlung von PChlid zum Chlid katalysiert, konnte in Roggen, der bei 33° C angezogen wurde, nachgewiesen werden (Griffiths & Beer, 1982).

Im Laufe dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Chlorophyll-Synthetase in Hafer- und Roggenkeimlingen, die unter diesen nichtpermissiven Bedingungen, d.h. bei erhöhter Temperatur angezogen werden, nachgewiesen werden kann.

1. Untersuchung der Chlorophyll-Synthetaseaktivität in Keimlingen, die bei erhöhter Temperatur angezogen wurden.

Es wurde die Enzymaktivität von bei 22° C und bei 32° angezogenen Keimlingen verglichen.

Dazu wurden diese in einen oberen Abschnitt (1/3) und in einen unteren Abschnitt (2/3) geteilt, da in den Spitzen der Keimlinge noch embryonal angelegte 70 S - Ribosomen vorhanden sind. Bei im Licht angezogenen Pflanzen wird dies daran sichtbar, daß die Spitzen (1/3 - Abschnitte) ergrünen.

Zunächst wurden die Aktivitäten von den 1/3 und 2/3 Abschnitten dunkel angezogener Keimlinge verglichen. Es zeigt sich, daß pro g FG die Aktivität in den Spitzen, d.h. den 1/3 Abschnitten wesentlich höher ist als in den basalen 2/3 Abschnitten. Dies deutet auf einen Blattgradienten hin mit einem Aktivitätsmaximum der Chlorophyll-Synthetase in den Spitzen und abnehmender Aktivität von der Spitze zum basalen Teil des Blattes. Dies gilt sowohl für Hafer als auch für Roggen, wobei der Unterschied bei Roggen deutlicher hervortritt als bei Hafer.

Tab. 22: Enzymaktivität in 1/3 und 2/3 Abschnitten von bei 22° und 33° C im Dunkeln angezogenen Keimlingen von Hafer und Roggen. Angaben in nmol Chl_{gebildet}/5g FG.

Anzuchttemperatur 22° C			33° C	
Pflanze	Roggen	Hafer	Roggen	Hafer
1/3:	2,23	2,41	1,33; 1,95	2,46
2/3:	.30; .32	1,84	.31; .38	1,33

Für die im Dunkeln angezogenen Keimlinge konnte für die 2/3 - Abschnitte (ribosomenfreie Teile) folgende Enzymaktivität ermittelt werden:

Tab. 23: Aktivität der Chlorophyll-Synthetase in Hafer- und Roggenkeimlingen, die bei 22° bzw. 33° C angezogen wurden.

	22° C	33° C
Roggen (2/3)	.29	.31
Hafer (2/3)	1,84	1,33
Werte in nmol Chl _{gebildet} / 5 g FG		

Dabei zeigt sich eindeutig, daß die Aktivität in den 70 S ribosomenfreien Etioplasten (33° C) genau so hoch ist, wie in den Standardpflanzen, die bei 22° C angezogen wurden. Dies gilt sowohl für Hafer als auch für Roggen. Daraus ist ersichtlich, daß die Chl-Synthetaseaktivität auch bei der nichtpermissiven Temperatur vorhanden ist, d.h., daß das Enzym kernkodiert ist und folglich im Cytoplasma auf 80 S Ribosomen translatiert wird.

Bei einem Vergleich der Enzymaktivität von Hafer und Roggen fällt auf, daß die Menge an synthetisiertem Chlorophyll im Hafer deutlich höher ist als im Roggen. Da die Untersuchungsbedingungen bei beiden Pflanzen gleich waren

könnte dies bedeuten, daß Hafer mehr oder aktivere Chlorophyll-Synthetase als Roggen enthält, sodaß Hafer für die Untersuchungen der Chlorophyll-Synthetase generell als das bessere Objekt betrachtet werden kann.

2. Untersuchung der Chlorophyll-Synthetaseaktivität in Envelope (Hüllmembranen) aus Erbsen.

Die Plastiden höherer Pflanzen sind von einer Doppelmembran, der sogenannten Hüllmembran oder auch Envelope umgeben, die sie gegen das Cytoplasma abgrenzt. In diesem Envelope werden eine Reihe von Substanzen synthetisiert wie z.B. Prenylchinone und Galactolipide. Er spielt auch eine wichtige Rolle beim Stoffaustausch zwischen Plastiden und dem Cytosol.

Envelope aus Erbsen wurde mit exogenen Substraten (Chlid, GGPP) inkubiert. Dabei zeigte sich, daß keine Veresterung zu Chl stattfand. Der Chlorophyllgehalt der inkubierten Probe entsprach dem endogenen Chlorophyllgehalt des Nullwertes (0,13 nmol Chlorophyll in 100 µl Envelope der nichtinkubierten Probe gegenüber 0,17 nmol Chlorophyll in der inkubierten Probe).

3. Anzucht von mit Chloramphenicol behandelten Pflanzen.

Durch Anzucht mit Chloramphenicol (1mg/ml - 7 mg/ml) konnten keine im Licht etiolierten Keimlinge erhalten werden. Bei der Konzentration von 1 und 2 mg Chloramphenicol / ml wurden die Keimlinge normal grün. Bei höheren Konzentrationen wurden die Keimlinge nur noch schwach grün, jedoch war auch das Wachstum stark beeinträchtigt. Dabei war es unbedeutend, ob die Keimlinge nur mit Wasser oder mit der entsprechenden Chloramphenicollösung gegossen wurden.

V. Untersuchung der Chlorophyll-Synthetaseaktivität in Hochgebirgspflanzen

Bringt man etiolierte Pflanzen ins Licht, so beginnen sie innerhalb weniger Stunden zu ergrünen. An verschiedenen Hochgebirgspflanzen konnte beobachtet werden, daß sie, auch wenn sie genügend Licht bekommen, nur zaghaft ergrünen (C. Lütz, persönliche Mitteilung). Diese Pflanzen leben unter extremen Temperaturbedingungen, z.B. am Rande von Schneefeldern oder bedeckt von einer mehrere cm dicken Schneeschicht. Solche Pflanzen wurden im Hinblick auf die Aktivität der Chlorophyllsynthetase näher untersucht. Dabei wurden verschiedene Ergrünungsstadien der Pflanzen bei unterschiedlichen Temperaturen mit ^{14}C -GGFP und exogen zugesetztem Chlorophyllid inkubiert. Die Ergebnisse sollten Aufschluß darüber geben, ob die Veresterung temperaturabhängig verläuft, bzw. ob sich Hinweise auf unterschiedliche Enzymmengen bei den verschiedenen Stadien ergeben.



Abb. 21 a: *Taraxacum alpinum*, etioliert

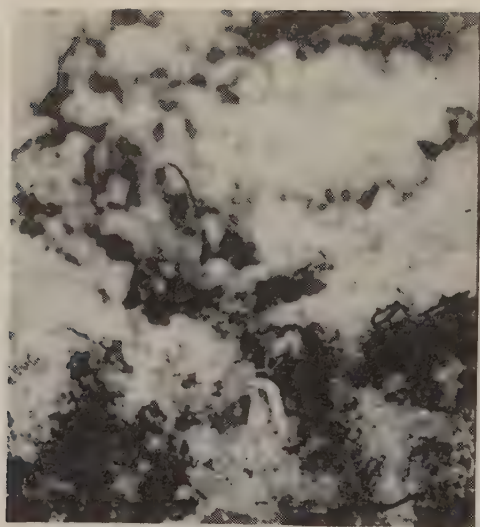


Abb. 21 b: *Lucula lutea*, etioliert

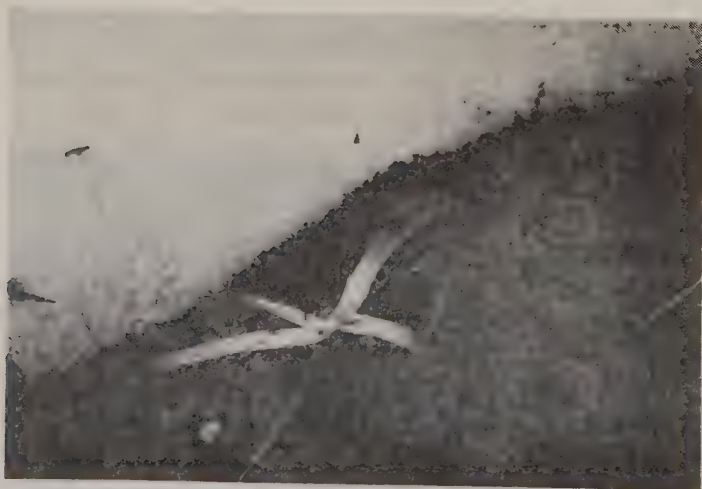


Abb. 21 c: *Eriophorum angustifolium*, "etioliert"

Abb. 21 a - 21 c: Standortphotos der untersuchten
Pflanzen

Entnahmen: Juli/August 1966

Standort: Hochalpen in der Nähe
von Überquagl, 2000 - 2500 m Höhe

1. Veresterung von Chlid und GGPP bei grünen und nicht ergrünnten Pflanzen von *Taraxacum alpinum* bei 6°, 12° und 25°.

Bei *Taraxacum alpinum* erfolgte der Test bei verschiedenen Stadien von Pflänzchen. Es wurden solche verwendet, die noch schneebedeckt waren und erst für Versuchszwecke ausgegraben wurden, ferner welche, die am Rande von Schneefeldern standen, d.h. nicht mehr von Schnee bedeckt waren. Zum Vergleich wurden voll ergrünte Pflanzen getestet.

Wie aus Tab. 24 ersichtlich ist, nimmt der %tuelle Einbau von ^{14}C -GGPP in Chlorophyll bei allen 3 Stadien mit sinkender Temperatur ab. Setzt man die eingebaute Radioaktivität (dpm) bei 25° = 100 % Enzymaktivität, so ergibt sich bei den noch nicht ergrünnten Pflanzen bei 6° eine Abnahme auf 9 bzw. 16 %. Bei den voll ergrünnten Pflanzen wurde der Einbau von ^{14}C -GGPP in Chl bei Erniedrigung der Temperatur auf 6° von 100 % auf 50 % reduziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Veresterungsreaktion unter den vorliegenden Bedingungen erwartungsgemäß temperaturabhängig verläuft, unabhängig vom Ergrünungsstadium der Pflanze.

Tab. 24: %tualer Einbau von ^{14}C -GGPP (dpm) in Chlorophyll bei 3 verschiedenen Ergrünungsstadien von *Taraxacum alpinum* in Abhängigkeit von der Temperatur. Plastiden aus 5 g FG wurden im Standardenzymtest (s.Tab. 6) mit 150 μl ^{14}C -GGPP, spezifische Aktivität = 4,7nCi/nmol, 30 μl = $4,2 \times 10^3$ cpm, 1,5 mM NADPH 45 Min. inkubiert.

Temperatur	25°	12°	6°
unter Schnee	100 %	58 %	16 %
neben Schnee	100 %	20 %	9 %
Grün	100 %	(15 %)	47 %

Angaben in % dpm

Betrachtet man die absoluten Mengen an gebildetem Chloro-

phyll (nmol/5g FG), so läßt sich diese Tendenz ebenfalls erkennen. Vergleicht man jedoch die absolut gebildete Menge an Chl bei den einzelnen Stadien bei der gleichen Temperatur, so zeigt sich, daß auch bei derselben Temperatur unterschiedliche Mengen an Chlorophyll gebildet werden, abhängig vom Ergrünungszustand. Ausgehend von der Menge des veresterten Pigmentes bei den voll ergrünnten Pflanzen mit 100 % reduziert sich dieses bis auf 6 % bei den nicht grünen Pflanzen (Tab. 25). Auf die absoluten Mengen an gebildetem Chlorophyll bezogen, bedeutet dies, daß die grünen Pflanzen bei 6° C noch mehr verestertes Pigment bilden als nicht ergrünte bei 25° (s. Tab. 25). Dies deutet auf unterschiedliche Mengen an Enzym bei grünen und noch nicht ergrünnten Pflanzen hin.

Tab. 25: Absoluter Einbau von ^{14}C -GGPP (nmol Chl gebildet/5g FG) in Chlorophyll bei 3 verschiedenen Ergrünungsstadien von *Taraxacum alpinum* in Abhängigkeit von der Temperatur. (Inkubationsansatz s. Tab. 24).

Temperatur	25°	12°	6°
unter Schnee	0,78	0,46	0,12
neben Schnee	1,86	0,38	0,16
Grün	5,11	0,79	2,42

Angaben in nmol Chl gebildet/5gFG

2. Hydrierung von Chl_{GG} zu Chl_{P}

Das, bei den verschiedenen Temperaturen und Ergrünungsstadien veresterte Pigment wurde mittels HPLC darauf untersucht, ob eine Hydrierung von Chl_{GG} zu Chl_{DHGG} , Chl_{THGG} und Chl_{P} erfolgt. Die Identifizierung der mit verschiedenen Alkoholen veresterten Pigmente erfolgte über Vergleichssubstanzen (Benz 1980). Die Auftrennung der verschiedenen Chlorophylle mittels HPLC führte zu der Erkenntnis, daß die Reduktion offensichtlich bei allen Entwicklungsstadien und Temperaturen möglich ist. Tab. 26 zeigt die prozentuale Verteilung der einzelnen Alkohole. Eine Temperaturabhängigkeit ist zunächst nicht eindeutig

zu erkennen.

Tab.26: HPLC-Auftrennung von ^{14}C -Chl_{GG}, DHGG, THGG, P bei *Taraxacum alpinum*. %uale Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Alkohole. (Auftrennung der Pigmente nach Reinigung über Dünnschichtchromatographie, Detektorwellenlänge: 667 nm, Säule Stahl, Lichrosorb RP 8, 7 µm, Methanol/H₂O = 95/5, 1,5 ml/Min. Die Bestimmung der Pigmente erfolgte als Pheophytin. Die einzelnen Peaks wurden mittels Vergleichssubstanzen identifiziert, getrennt gesammelt und die Radioaktivität bestimmt.

Taraxacum alpinum, schneebedeckt			
	25°	12°	6°
Chl _{GG} , DHGG	67 %	75 %	72 %
Chl _{THGG} , P	32 %	25 %	28 %
Taraxacum alpinum, neben Schnee			
Chl _{GG} , DHGG	90 %	69 %	80 %
Chl _{THGG} , P	10 %	31 %	20 %
Taraxacum alpinum, grün			
Chl _{GG} , DHGG	77 %	69 %	62 %
Chl _{THGG} , P	23 %	31 %	38 %

Die absoluten Pigmentmengen (nmol Chl) sind Tab.25 zu entnehmen.

Vielmehr ist der Anteil des Chl_{THGG}, P am Gesamtpigment bei 6° höher als bei 25°, unabhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze. Das dürfte darauf beruhen, daß das Hydrierungssystem labiler ist und langsamer arbeitet (Benz, 1980) als das Veresterungssystem. Folglich ist bei höheren Veresterungsraten der Anteil an hydrierten Stufen geringer als bei niedrigen Veresterungsraten, da bei niedrigen Veresterungsraten das hydrierende System besser mit der Veresterung Schritt halten kann.

Die mit *Taraxacum alpinum* erhaltenen Ergebnisse konnten außerdem bei der Untersuchung von 2 monokotylen Pflanzen, *Luzula lutea* und *Eriophorum angustifolium* bestätigt werden (Tab. 27 und 28). Es zeigt sich ebenfalls die verminderte Veresterung bei abnehmender Temperatur. Ein Vergleich mit grünen Pflanzen wurde hier nicht durchgeführt.

Tab. 27: Absoluter Einbau von ^{14}C -GGPP (nmol Chl gebildet/5g FG) in Chlorophyll in etiolierte Pflanzen von *Eriophorum angustifolium* und *Luzula lutea* in Abhängigkeit von der Temperatur. (Inkubationsansatz siehe Tab. 24).

Temperatur	25°	12°	6°
<i>Eriophorum angustifolium</i>	1,12	0,35	0,24
<i>Luzula lutea</i>	-	0,39	0,10

Tab. 28: HPLC-Auftrennung von ^{14}C -Chl_{GG}, DHGG, THGG, P bei *Eriophorum angustifolium* und *Luzula lutea*. %tuelle Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Alkohole. (Bedingungen siehe Tab. 26).

Eriophorum angustifolium, etioliert			
Temperatur	25°	12°	6°
Chl _{GG} , DHGG	72 %	58 %	50 %
Chl _{THGG, P}	28 %	42 %	50 %
Luzula lutea, ~			
Chl _{GG} , DHGG	-	73 %	47 %
Chl _{THGG, P}	-	27 %	53 %

Die absoluten Pigmentmengen sind Tab. 27 zu entnehmen.

3. Endogener Pigmentgehalt der Proben

Pigmentuntersuchungen von nichtinkubierten Pflanzen zeigten, daß in allen Stadien bereits Chl vorlag, jedoch in deutlich unterschiedlichen Mengen. Durch die Auftrennung mit

HPLC konnte gezeigt werden, daß dieses endogen vorhandene Chl ausschließlich als Chl_P vorlag.

Tab. 29: Endogener Pigmentgehalt der Pflanzen in nmol Chl/5g FG
Bestimmung: Die Pigmente wurden aus einem Aliquot des Plastidenhomogenats (s.S. 37) extrahiert und für 5 g FG berechnet.

Ergrünungszustand	grün	etioliert
<i>Taraxacum alpinum</i>	918,8	17,26; unter Schnee 43,21; neben Schnee
<i>Eriophorum angustifolium</i>	45,2	1,55
<i>Luzula lutea</i>	122,2	9,41

Es sei darauf hingewiesen, daß diese Werte aufgrund der Extraktionsmethode (Extraktion aus Plastidenhomogenat) nur den relativen Pigmentgehalt der Pflanzen zueinander darstellen und nicht den absoluten Pigmentgehalt der Pflanzen. Dieser dürfte wesentlich höher liegen.

D. Diskussion

I. Solubilisierung und Charakterisierung der Chlorophyll-Synthetase aus Haferetioplasten

Die Aufreinigung von Membranproteinen wird dadurch erschwert, daß die Proteine aus der Membran herausgelöst werden müssen, bevor weitere Aufreinigungsversuche durchgeführt werden können. Zur Solubilisierung von Membranen werden in erster Linie Detergentien (Helenius & Simons, 1975) angewendet. Im allgemeinen werden 3 Arten von Detergentien zur Membransolubilisierung verwendet: ionische, nicht-ionische und zwitterionische Tenside (Gonenne & Ernst, 1978, Helenius & Simons, 1975). Zu den ionischen Detergentien gehört z. B. SDS, ein äußerst effektives Detergenz, das vor allem bei der Solubilisierung von Thylakoidmembranen und Chl-Proteinen (Leong & Anderson, 1984, Argyroudi-Akoyunoglou, 1984, Argyroudi-Akoyunoglou & Thomou, 1981) angewendet wird. Aufgrund seiner stark denaturierenden Wirkung (Gonenne & Ernst, 1977, Helenius & Simons, 1975, Tanford & Reynolds, 1976) erscheint es für die Solubilisierung von Enzymen in aktiver Form ungeeignet. Ein weiterer Nachteil von ionischen Detergentien besteht darin, daß sie zusätzlich Ladungen tragen, die sich ungünstig auf weitere Aufreinigungsschritte auswirken können (Hildreth, 1982, Hjelmeland et al. 1979). Im Hinblick auf diese Daten wurde bei dieser Arbeit auf den Test von ionischen Detergentien zur Solubilisierung der Chl-Synthetase verzichtet und nur zwitterionische und nicht-ionische Detergentien getestet.

Bei den zwitterionischen Detergentien wurden die Sulfobetaine SB 12 und SB 14, sowie CHAPS getestet. Die Fähigkeit der Sulfobetaine, Membranen effektiver als nicht-ionische Tenside zu solubilisieren, wird von Gonenne & Ernst (1978) beschrieben. Auch bleibt bei den von diesen Autoren getesteten Enzymen die Aktivität erhalten, sodaß sie zu dem Schluß kommen, daß Sulfobetaine eine nicht denaturierende Wirkung auf lösliche und Membranproteine

haben. Wie in Punkt C.II.4. bereits dargestellt, konnte dies für die Chlorophyll-Synthetase nicht bestätigt werden. Die Anwendung von 0,2 - 1 % SB 12 bzw. SB 14 führte zwar ebenfalls zur Solubilisierung der Membran, jedoch zugleich auch zu einer vollständigen Denaturierung des Enzyms, sodaß keinerlei Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Auch die Anwendung von GGPP, Lecithin und NADPH als mögliche Schutzsubstanzen zeigte keine positiven Effekte auf die Enzymaktivität. Dies steht in Einklang mit den Befunden von Hjelmeland (1979, 1980), der ebenfalls eine denaturierende Wirkung der Sulfobetaine feststellt. Er entwickelte ein weiteres zwitterionisches Detergenz, einen Abkömmling der Cholsäure mit den geladenen Gruppen der Sulfobetaine, das 3- (3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio -1- propansulfonate (CHAPS) genannt. Es soll Proteine wesentlich schonender solubilisieren als die Sulfobetaine, ohne daß dabei die Effizienz der Solubilisierung leidet (Hjelmeland, 1980).

Mit CHAPS ist unter anderem die erfolgreiche Solubilisierung von Cytochrom P 450 (Hjelmeland, 1980), das mit einer Mischung aus SB 14 und Triton X 100 nur unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert werden konnte (Hjelmeland et. al., 1979) sowie eines Opiumrezeptors (Simonds et al., 1980) und eines Prolactinrezeptors (Liscia et al. 1982) gelungen.

Matuo et al. (1985) konnten bei der Solubilisierung von Nicht-Histon Chromosomalen Proteinen mit SB 12, SB 14 und CHAPS feststellen, daß die Wirkung recht unterschiedlich ist. SB 12 stellte sich bei der Solubilisierung des Gesamtproteins von Kernen aus Rattenleber effektiver als CHAPS dar. Was jedoch die Aktivität der untersuchten Enzyme betraf, so zeigte sich, daß RNA Polymerase und Isopeptidase durch 1 % CHAPS nur wenig beeinträchtigt wurden, während eine Konzentration von 0,3 % SB 12 die Isopeptidaseaktivität zerstörte.

Die gegenüber SB 12 und SB 14 schonendere Wirkung von CHAPS zeigte sich auch bei der Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase bei Konzentrationen zwischen 0,1 und

0,3 %. Wenn man davon ausgeht, daß solubilisierete Proteine bei einer Ultrazentrifugation (78.000 g) im Überstand bleiben und nicht sedimentieren, muß hier jedoch davon ausgegangen werden, daß die Solubilisierung mit 0,1 - 0,3 % CHAPS nicht vollständig erfolgte, da ein großer Anteil der Aktivität bei der Zentrifugation im Sediment wiedergefunden wurde, ähnlich der Solubilisierung mit 50 % Glycerin. Von einer Erhöhung der Konzentration mußte aufgrund der dann eintretenden Inaktivierung des Enzyms Abstand genommen werden.

Des weiteren wurden Detergentien aus der Polyoxyethylenethergruppe untersucht, nichtionische Detergentien, von denen vor allen Dingen Triton X 100 weite Anwendung in der Membransolubilisierung gefunden hat (Apel et al. 1980, Beer & Griffiths, 1981, Hladik & Sofrova, 1980, Ill'ina et al., 1981). Weitere Vertreter der Polyoxyethylenether sind die Brij-Detergentien. Der Unterschied zwischen Triton X 100 und den Brij Detergentien besteht zum einen darin, daß ersteres einen Arylether darstellt während es sich bei zweiteren um Alkylether handelt (Hildreth 1982). Unterschiede in der Wirkung liegen gemäß Helenius et al. (1979) in einer geringeren Solubilisierungsstärke der Alkylether. Wie in Punkt C.II.2.7. dargelegt, wurde die Chlorophyll-Synthetase auch durch Triton X 100, Brij 30, 56 und 58, die in den Konzentrationen von 0,1 - 2 % getestet wurden, quantitativ inaktiviert. Weniger aggressiv gegenüber der Aktivität verhielt sich dagegen Brij W1, das einzige Detergenz der Polyoxyethylenethergruppe, mit dem eine Solubilisierung des aktiven Enzyms möglich war.

Octylglucosid, ebenfalls ein nichtionisches Detergenz, das erfolgreich zur Solubilisierung von Thylakoidmembranen verwendet wurde (Camm & Beverley, 1980) ist offensichtlich ebenfalls zu aggressiv um für die Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase erfolgreich angewendet werden zu können. Auch hier konnte durch Zugabe von möglichen Schutzsubstanzen kein positiver Effekt erzielt

werden.

Mit Digitonin, einem Sterolglykosid, das ebenfalls zu den nichtionischen Detergentien gehört, konnte zwar die Membran im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 und 7 % gleichermaßen gut solubilisiert werden, jedoch auch unter Beeinträchtigung der Enzymaktivität; diese belief sich nur noch auf 34 - 6 % bezogen auf die Aktivität der nichtsolubilisierten Etioplastensuspension.

Die Zugabe von Substraten oder Lipiden, die Membranproteine bei der Solubilisierung schützen oder aktivieren können (Apel et al. 1980, Sandermann 1983, Steiger et al. 1985) zeigte bei der Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase keinen Erfolg.

Kombiniert man die Ergebnisse der Solubilisierungsversuche dieser Arbeit mit Literaturkenntnissen über die Solubilisierung verschiedener Membranproteine, so läßt sich folgendes festhalten:

Die Wirkung desselben Detergenzes auf verschiedene Enzyme ist recht unterschiedlich (Hjelmeland et al. 1979, Hjelmeland 1980, Matuo et al. 1985), sodaß man die bei einem Enzym gewonnen Erkenntnisse nur bedingt auf andere Enzyme übertragen kann.

Diese Unterschiede dürften unter anderem auf die Empfindlichkeit des jeweiligen Proteins gegenüber äußeren Einflüssen beruhen. Die Chlorophyllsynthetase scheint ein im solubilisierten Zustand sehr sensibles Enzym darzustellen, da seine Aktivität durch nahezu alle Detergentien, auch von solchen, die in der Literatur als schonend beschrieben sind, beeinträchtigt und durch die meisten sogar quantitativ zerstört wurde, wobei auch die Zugabe von Schutzsubstanzen dies nicht verhindern konnte.

Die extreme Empfindlichkeit der Chlorophyll-Synthetase in solubilisierter Form zeigte sich auch gegenüber Salzen (im 100 mM - 1M Bereich) und konzentrierten Puffern (100

mM - 1 M), die angewendet wurden um ihre Eignung für die Aufreinigung des Enzyms zu prüfen. Dabei applizierte Schutzsubstanzen wie Chlid, Prolin und BSA zeigten einen bedingt schützenden Effekt, während sich GGPP und Pheid als vollkommen ineffektiv erwiesen. Rückschlüsse darauf, wie eine schützende Substanz beschaffen sein sollte, lassen sich daraus nur bedingt ableiten. Pheid, das sich vom Chlid nur durch das Fehlen des zentralen Magnesiumatoms unterscheidet, scheint keinerlei schützende Funktion auszuüben. Prinzipiell kann davon ausgegangen werden, daß die auftretenden Wechselwirkungen zwischen Enzymprotein und äußerem Milieu die Enzymaktivität in so negativer Weise beeinflussen, daß durch Verdünnen der Salzkonzentration oder Anwendung von Schutzsubstanzen nur eine geringfügige Erhöhung der Enzymaktivität erreicht werden kann.

2. Charakterisierung des mit 0,1 % Brij W1 solubilisierten Enzyms.

Für das solubilisierete Enzym läßt sich im physiologischen Bereich kein ausgeprägtes pH-Optimum feststellen. Die Enzymaktivitäten zwischen pH 7,0 und 9,1 zeigten nur geringfügige Unterschiede. Die beobachtete Abnahme der Enzymaktivität im pH-Bereich unter 7,0 könnte indirekt durch eine Instabilität des Substrates GGPP (Benz 1980 a) in diesem Bereich oder direkt durch eine Empfindlichkeit des Enzyms im sauren pH-Bereich bedingt sein.

Bezüglich der Substratspezifität konnte die bereits für das membrangebundene Enzym in Etioplasten gefundene Präferenz von GGPP gegenüber PPP (Rüdiger et al., 1980) bestätigt werden. Eine Veresterung mit FPP und IPP konnte dagegen mit der solubilisierten Chlorophyll-Synthetase nicht mehr gezeigt werden.

Untersuchungen zur Abhängigkeit der Enzymaktivität von der zugesetzten Substratmenge (GGPP, PPP), zeigten, daß bereits bei einer 6 - 24 μ M Konzentration (4-16 facher Überschuß des Alkohols gegenüber Chlid) der Sättigungsbe-

reich erreicht wurde. Höhere Konzentrationen führten zu einer Hemmung der Enzymaktivität. Ursache hierfür könnte eine Substrathemmung durch den Alkohol sein oder aber auch eine modifizierte Produkthemmung. Diese könnte dadurch bedingt sein, daß eine Ablösung des umgesetzten Produktes (Chl) vom Enzymkomplex verhindert wird aufgrund des Fehlens von intakten Membranen, in die das Chlorophyll normalerweise integriert wird oder aber, daß vorhandene Bindungsstellen besetzt sind z.B. durch GGPP. Dadurch könnte es am Enzym zu einer Blockierung der Bindungsstellen für weitere Substratmoleküle kommen.

II. Aufreinigungsversuche

Bei der Glyceringradientenzentrifugation dürfte die Anwesenheit von Detergenz im Gradienten entscheidend für die Auftrennung von verschiedenen Proteinbanden sein. Dies kann zumindest aus dem Vergleich von Gradienten mit und ohne Detergenz gefolgert werden. Ohne Detergenz vermag solubilisiertes Protein offenbar nicht in den Gradienten einzudringen sondern verbleibt auf dem Gradienten. Bei dem sich bildenden Pellet dürfte es sich um noch partikulär gebundenes Protein handeln, das aufgrund seiner Dichte sedimentiert. Die Anwendung von konzentrierteren Auftragsvolumina konnte an diesem Verhalten der Proteine nichts ändern. Die Proteinprofile zeigten im Prinzip die gleiche Proteinverteilung. Entsprechend der Proteinverteilung verhielt sich auch die Verteilung der Enzymaktivität der Chl-Synthetase, die sich nur im Auftrag bzw. im Pellet nachweisen ließ.

Eine Proteinauftrennung konnte dagegen erreicht werden, wenn der gesamte Gradient 0,1 % Detergenz enthielt. Offenbar wird dadurch die Verteilung des Proteins im Gradienten erleichtert. Das auch hier wieder größte Problem stellt die Instabilität des Enzyms dar: Normalerweise bei Proteinaufreinigungen angewendete Zentrifugationszeiten mußten verkürzt werden, damit überhaupt noch Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die Ausbeuten an Enzymaktivität zwischen 7 und 27 % zeigen, daß auch nach kurzen Zen-

trifugationszeiten ein großer Verlust der Aktivität nicht zu vermeiden ist.

Aufgrund der durch die Stufengradienten erreichten Auftrennung in mehrere proteinhaltige Banden mit einem Aktivitätsmaximum der Chl-Synthetase bei ca. 20 % Glycerin (s. Abb. 10) wurde zunächst vermutet, daß eine unterschiedliche qualitative Proteinverteilung bei den einzelnen Banden zu erkennen sein sollte. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Proteinzusammensetzung der einzelnen Banden des Gradienten unterschied sich nicht wesentlich voneinander (s. Abb. 11).

Die Chromatographie mit dem Kationenaustauscher läßt den Schluß zu, daß unter den gegebenen Bedingungen die Chlorophyll-Synthetase nicht an den Kationenaustauscher bindet und somit ein vermuteter IEP von pH 8,8 (Gronau, 1983) für die Synthetase unwahrscheinlich erscheint. Bei pH 7,5 erfolgte dagegen offenbar die Bindung des gesamten nachweisbaren Proteins an den Anionenaustauscher DE 52. Die Elution von Protein, die durch die Anwendung eines Salzgradienten erreicht werden konnte, war jedoch nicht mit der Elution von Enzymaktivität korreliert. Aufgrund der Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber Salzen kann wahrscheinlich davon ausgegangen werden, daß es zwar von der Säule eluiert wurde, jedoch in inaktiver Form und es so nicht möglich war, Aktivität nachzuweisen.

Die Ursachen dafür, daß die bei der Anionenaustauschchromatographie angewendeten Schutzsubstanzen Chlid und Prolin keinerlei positiven Effekt auf die Enzymaktivität zeigten, könnten unter Umständen darin begründet sein, daß beide Substanzen an das Austauschmaterial binden und so aus der Lösung entfernt werden und dadurch nicht mehr in der Lage sind, eine schützende Funktion auszuüben.

Es ist offenbar auch nicht möglich, die Chl-Synthetase unter den vorliegenden Bedingungen mit Molekularsieb aufzureinigen. Die Ausbeute an wiedergefundener Aktivität mit 50 - 70 % wäre zwar hervorragend für

einen Aufreinigungsschritt. Da die Hauptmenge an Protein und Aktivität jedoch immer im Ausschlußvolumen eluiert wurde, kann daraus unter Umständen geschlossen werden, daß die Micellengröße zu groß ist, um eine Aufreinigung über Molekularsieb erfolgreich durchführen zu können. Dies kann zum einen dadurch bedingt sein, daß Brij W 1 von Haus aus große Micellen bildet, unter Umständen aber auch dadurch, daß die Konzentration an Detergenz zu gering war um größere Aggregate zu zerstören (Helenius 1979). Da jedoch bereits die Beibehaltung der Konzentration von 0,1 % zu einer Verminderung der Aktivität führte, ohne daß die Auftrennung verbessert werden konnte und da auch die Daten aus Tab. 12a auf eine Destabilisierung des Enzyms durch gesteigerte Detergenzkonzentrationen hindeuten, wurde von einer weiteren Erhöhung der Detergenzkonzentration Abstand genommen.

Die Angaben über die Eignung der Molekularsiebchromatographie zur Auftrennung von Membranproteinen sind widersprüchlich. Das Hauptproblem, das sich offensichtlich ergibt, liegt in der Neigung von Detergenz-Protein-Lipidlösungen zur Bildung von Aggregaten aus Proteinen und Detergenz (Helenius et al. 1979, Hjelmeland 1980, Tanford 1976), die höhermolekulare Gewichte haben als die einzelnen Proteine. Die Auftrennung durch Molekularsieb wird dadurch erheblich erschwert. Die Größe der gebildeten Aggregate hängt in der Regel vor allem von der Art des Detergenzes ab (Helenius 1979). Daneben können auch noch Faktoren wie Ionenstärke (Tanford 1976) eine Rolle spielen. Theoretisch gesehen müßte es so ein, daß Detergentien, die kleinere Micellen bilden, die Auftrennung über Molekularsieb erleichtern, während größere Micellen dazu führen, daß die Proteine aus der Gelmatrix ausgeschlossen werden (Hjelmeland 1983). In der Praxis scheint dies aber nicht unbedingt zuzutreffen. So konnten z.B. Beer & Griffith (1981) eine Aufreinigung der Protochlorophyllidreduktase mittels Gelfiltration über Sephadex G 150 erreichen, wobei als Detergenz Triton X 100 verwendet wurde, das ebenfalls wie Brij W1 zu den Polyoxyethylenethern gehört, die in der Regel größere Micellen bilden als verschiedene

andere Detergentien.

Die erfolgreiche Aufreinigung einer ATPase aus einem thermophilen Bakterium mittels Tritonsolubilisierung und Gelfiltration wird von Sone et al. (1975) beschrieben. Ebenfalls mit Polyoxyethylenetherdetergentien (Brij 58, Triton X 100) konnten Klingenberg et al (1979) die Isolierung und Aufreinigung eines ADP-ATP-Carriers über Molekularsiebchromatographie erreichen.

Die Ergebnisse der mit Brushite und Hydroxylapatit durchgeführten Versuche deuten daraufhin, daß die angewandten Bedingungen von der Chl-Synthetase toleriert werden.

Bei den Bindungsversuchen zeigt die Verteilung der Enzymaktivität zwischen Durchlauf- und Waschfraktion bzw. Eluat, daß es selbst bei niedrigen Molaritäten der verwendeten Puffer (10 mM KPP, pH 7,5, 20 mM Tricin, pH 7,5) nicht möglich ist, die aufgetragene Aktivität quantitativ an die Säule zu binden. Dies wird auch für verschiedene andere Proteine von Bernardi (1973) beschrieben. Offenbar sind die Adsorptionskräfte zwischen dem Hydroxylapatit und der Chl-Synthetase relativ schwach. Wie sich im weiteren Verlauf zeigte, erfolgte auch die Elution des gebundenen Enzyms bei relativ geringen Molaritäten, d.h., unter 50 mM KPP. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß es sich bei der Chl-Synthetase um ein saures oder neutrales, jedoch kein basisches Protein handelt. Gemäß Bernardi (1973) und Gorbunoff (1984) werden basische Proteine nur bei hohen Molaritäten von KPP eluiert, wogegen für saure und neutrale Proteine bereits geringe Molaritäten ausreichen.

Die Aufreinigung von Protein konnte unter den vorliegenden Bedingungen als zufriedenstellend betrachtet werden. Wie Abb. 18 und 20 zeigen, ergeben sich bei der PAGE deutliche Unterschiede in den Proteinmustern der einzelnen Elutionsbereiche. Das speziell die Aufreinigung der Synthetase betreffende Problem besteht darin, daß in dem niedermolaren Pufferbereich, in dem sie eluiert wird,

auch sehr viele andere Proteine eluiert werden, sodaß keine Zuordnung der Aktivität zu spezifischen Banden erfolgen konnte.

Bei der hydrophoben Chromatographie mit Octyl-Sepharose sind die Wechselwirkungen zwischen Gelmatrix und solubilisierten Etioplastenmembranen offenbar so stark, daß eine Elution der Proteine unter für die Chlorophyll-Synthetase schonenden Bedingungen (niedrige Detergenzkonzentration, geringe Ionenstärke) nicht möglich war und aus diesem Grunde auf eine weitere Anwendung verzichtet wurde.

Auch die Chromatographie mit Affi-Gel 10 zeigte sich als ungeeignet für die Aufreinigung der Chlorophyll-Synthetase. Als Ligand war zunächst Pheid an das Gelmateri-
al gekoppelt worden, was offenbar aufgrund des fehlenden zentralen Mg-Atoms möglich war, im Gegensatz zu Chlid das nicht angekoppelt werden konnte. Es wurde dabei von der Voraussetzung ausgegangen, daß die Chlorophyll-Synthetase unter Umständen eine Affinität zum Pheid (das sich vom Substrat Chlid nur durch das fehlende zentrale Mg-Atom unterscheidet) besitzt und deshalb bindet. Bei einer stärkeren Affinität zum echten Substrat Chlid hätte eine Elution durch dieses erfolgen können. Beim Test der Säule zeigte sich, daß ca. 50 % der aufgetragenen Enzymaktivität im Durchlauf der Säule und keine im Eluat gefunden werden konnte. Daraus läßt sich interpretieren, daß entweder die Chlorophyll-Synthetase überhaupt nicht an das Pheid bindet und die Aktivität mit 50 % Verlust im Durchlauf wiedergefunden wird oder die Affinität zu Pheid sehr schwach ist und deshalb nur ein Teil bindet, der jedoch durch Chlid nicht mehr eluiert werden kann. Aufgrund der Arbeiten von Benz und Rüdiger (1981), Rudoi & Shlyk (1982) und der hier gemachten Feststellung, daß Pheid keinerlei schützende Funktion auf die Chlorophyll-Synthetase ausübt, erscheint erstere Möglichkeit, nämlich eine fehlende Affinität des Enzyms zum Pheid wahrscheinlicher.

III. Untersuchungen zum Syntheseort der Chlorophyll-Synthetase.

Bislang war es nicht bekannt, ob die Chlorophyll-Synthetase kernkodiert ist und im Cytoplasma an 80 S - Ribosomen synthetisiert und in die Plastiden transportiert wird oder ob sie in den Plastiden selbst kodiert ist und an 70 S Ribosomen gebildet wird.

Eine klassische Methode zur Hemmung der cytoplasmatischen Proteinsynthese an 80 S - Ribosomen ist die Anwendung des Antibiotikums Cycloheximid, während die Anwendung von Chloramphenicol die Funktion der 70 S - Ribosomen beeinträchtigt. Beide Antibiotika wurden bereits zur Untersuchung der Chlorophyll-Biosynthese herangezogen. Das Ergrünen von Pflanzen wird durch Cycloheximid durchwegs stärker gehemmt als durch Chloramphenicol (Beisenherz & Schneider 1974, Kirk 1968). Eigene Versuche bezüglich der Wirkung von Chloramphenicol auf das Ergrünen von Haferkeimlingen zeigten ebenfalls, daß die Chlorophyllbildung zwar beeinträchtigt, jedoch nicht vollständig gehemmt wurde.

Als generelle Schlußfolgerung derartiger Versuche kann festgehalten werden, daß für die Akkumulation von Chlorophyllen die Biosynthese von Plastidenproteinen notwendig ist. Dabei dürfte es sich um verschiedene Thylakoidproteine handeln (Kirk 1968).

Feierabend et al. (1976, 1977) beschreiben eine Methode, bei der die Plastidenproteinsynthese durch das Fehlen von 70 S - Ribosomen ausgeschaltet wird. Die Pflanzen werden dabei erhöhter Temperatur (32°C) angezogen.

Gegenüber der Möglichkeit, die cytoplasmatische bzw. plastidäre Proteinsynthese durch Antibiotika zu inhibieren, besitzt die Methode von Feierabend et al. den Vorteil, daß nur die Plastidenproteinsynthese beeinflusst wird (Schä-

fers & Feierabend 1976), während die Antibiotika auch andere Zellfunktionen (Mitochondrienproteinsynthese, Elektronentransport) (Kirk & Tilney-Basset, 1978) mit beeinträchtigen können.

Ferner sind die bei erhöhter Temperatur angezogenen Pflanzen vollkommen chlorotisch (Rademacher & Feierabend, 1976). Feierabend (1977) konnte zeigen, daß bei den chlorotischen Blattabschnitten die Aktivität der 5- Aminolaevulinsäuresynthetase deutlich erniedrigt ist. Bei Inkubation mit 5 -Aminolaevulinsäure konnte jedoch eine Bildung und Anhäufung von PChlid im Dunkeln erzielt werden, was auf eine cytoplasmatische Synthese der Enzyme zwischen 5-Aminolaevulinsäure und PChlid im chlorotischen Gewebe hinweist. Die Synthese dieser Enzyme erfolgt demnach nicht in den Plastiden, sondern im Cytoplasma. Griffiths & Beer (1982) konnten zeigen, daß auch die PChlid-Reduktase cytoplasmatischen Ursprungs ist.

Der hier erfolgte Nachweis, daß die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase in diesen bei erhöhter Temperatur angezogenen Pflanzen vorhanden ist, und zwar in nahezu gleicher Größe wie in Kontrollpflanzen, die bei 22 ° C angezogen wurden, zeigt, daß auch die Chlorophyll-Synthetase cytoplasmatischen Ursprungs ist. Es muß darauf hingewiesen werden, daß im Falle des Fehlens der Chlorophyll-Synthetaseaktivität unter diesen Bedingungen der Schluß, daß das Enzym plastidenkodiert sei, nicht zulässig wäre. Es könnte durchaus sein, daß das Enzymprotein vorliegt, jedoch inaktiv bleibt aufgrund des Fehlens von für die Aktivität nötigen, plastidär synthetisierten Faktoren. In diesem Falle könnte der Nachweis nicht über die Enzymaktivität sondern nur über den direkten Nachweis des Proteins erfolgen.

Die Chlorose der bei 32° C angezogenen Pflanzen kann somit nicht auf einen Block in der Chlorophyllbiosynthese zurückgeführt werden, da offensichtlich alle für diesen Biosyntheseweg benötigten Enzyme gebildet werden. Feierabend (1977) diskutiert auch die Möglichkeit, daß in

diesen Pflanzen das Chlorophyll zwar gebildet wird, jedoch aufgrund des Fehlens von intakten Membranstrukturen in den Plastiden nicht in diese integriert und damit auch nicht stabilisiert werden kann. Dadurch wird es leichter photooxidativ zerstört. Auch Kirk (1967) vermutete auf Grund von Versuchen mit Antibiotika bei *Euglena gracilis* als Ursache für die Beeinträchtigung der Chl-Akkumulation die Inhibierung der Synthese von Thylakoidproteinen.

Während die Plastiden etiolierter, bei Normaltemperatur angezogener Pflanzen aus Prolamellarkörpern und Prothylakoiden bestehen, enthalten die Plastiden von etiolierten, bei 32° C gezogenen Roggenpflanzen vor allem Prolamellarkörper und tubuläre Strukturen, jedoch keine Prothylakoidstrukturen (Feierabend et al. 1969). Bei 32° C im Licht angezogene Pflanzen enthalten keine normalen Chloroplasten sondern sehr viel kleinere Plastiden, die von einer Doppelmembran, dem inneren und äußeren Envelope umgeben sind und Proplastiden ähnlich sind. Die inneren Membranstrukturen sind dagegen stark degeneriert; Grana fehlen vollkommen. Vereinzelt findet man thylakoidähnliche Gebilde, Membranvesikel sowie ebenfalls tubuläre Strukturen, die unter Umständen auf prolamellarkörperähnliches Material zurückzuführen sind (Schäfers & Feierabend 1976). Da die cytoplasmatische Proteinsynthese auch bei erhöhter Anzuchttemperatur die Synthese eines funktionsfähigen Envelopes mit den Mechanismen für die Erkennung und Aufnahme von Chloroplastenproteinen, die im Cytoplasma translatiert werden, bewirkt, (Feierabend & Schrader-Reichhardt, 1976), kann davon ausgegangen werden, daß die Chlorophyll-Synthetase auch in die Plastiden transportiert wird. Dafür sprechen auch im Laufe dieser Arbeit durchgeführte Versuche mit Envelope aus Erbsenchloroplasten; dabei konnte im Envelope keine Chlorophyll-Synthetaseaktivität nachgewiesen werden (S.90). Dies bestätigt die Arbeiten von Block et al. (1980), die zeigten, daß Envelope und Stromafraktion aus Spinat nicht in der Lage sind, Chlorophyll zu synthetisieren. In ihren Versuchen war jedoch nicht eindeutig zu unterscheiden, ob dies an einem Chlorophyllidmangel oder am fehlenden Enzym

lag. Aufgrund der exogenen Zugabe aller Substrate in dieser Arbeit ist nunmehr als Ursache für die unterbleibende Veresterung das Fehlen der Chlorophyll-Synthetase im Envelope nachgewiesen worden.

Da in den im Dunkeln bei 32° C angezogenen Pflanzen gemäß Feierabend et al. (1969) keine Thylakoidstrukturen vorkommen, müßte die Chlorophyll-Synthetase in diesen Pflanzen im Prolamellarkörper vorliegen. Dies würde der Lokalisation der PChlid-Reduktase in Prolamellarkörpern entsprechen, wie sie von verschiedenen Autoren für Weizen (Dehesh & Ryberg, 1985) sowie Kürbis (Ikeuchi & Murakami 1983) beschrieben wird.

In Etioplasten aus bei Normaltemperatur angezogenen Haferkeimlingen konnten Lütz et al. (1981) Chlorophyll-Synthetaseaktivität sowohl in der Prolamellarkörperfraktion als auch in den Prothylakoiden nachweisen, wobei sie die Hauptaktivität in den Prothylakoiden vermuten. Die Zuordnung der Enzymaktivität zu Prolamellarkörpern oder Prothylakoiden erscheint jedoch speziell bei Hafer durch die Anwesenheit von Saponinen (Kesselmeier 1982, Lütz & Nordmann 1983) stark erschwert zu sein. Um eindeutige Aussagen über die genaue Lokalisation der Chlorophyll-Synthetase im Etioplasten treffen zu können, bedarf es einer Verbesserung der Trennung von Prolamellarkörpern und Prothylakoiden.

IV. Untersuchungen der Chlorophyll-Synthetaseaktivität in Hochgebirgspflanzen

Untersuchungen von Lütz (persönliche Mitteilung) hatten gezeigt, daß im Licht wachsende, jedoch unter extremen Bedingungen (Hochgebirge, Schneegrenze) angesiedelte Pflanzen von *Taraxacum alpinum* als auch verschiedene andere Pflanzen wie die Monokotyledonen *Luzula lutea* und *Eriophorum angustifolium* nur zaghaft ergrünen. Die Blätter sind dann ganz oder teilweise gelb. Die Struktur der Plastiden ähnelt dabei Etioplasten.

Solche Pflanzen wurden im Vergleich mit bereits voll ergrünzten Pflanzen auf Synthetaseaktivität bei verschiedenen Temperaturen (6° , 12° , 25° C) untersucht.

Dabei zeigte sich, daß die Veresterung unabhängig vom Ergrünungsstadium der Pflanzen mit sinkender Temperatur stark abnahm. Diese Temperaturabhängigkeit der veresternden Reaktion im Gegensatz zur Photoreduktion des Protochlorophyllids zum Chlid wurde bereits 1957 von Wolff & Price für *Phaseolus vulgaris* beschrieben. Keckeis (1983) konnte dies ebenfalls für *Avena sativa* zeigen.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich außerdem, daß die Menge an in vitro gebildetem Chlorophyll in grünen Pflanzen wesentlich höher war als in den bei tiefer Temperatur gewachsenen Pflanzen. Dies scheint ein Hinweis darauf zu sein, daß bei den, bei niederen Temperaturen wachsenden, etiolierten Pflanzen die Chlorophyll-Synthetase in geringerer Konzentration vorhanden ist. Ob parallel dazu auch andere Proteine vermindert vorliegen, ist nicht bekannt. Eine Ursache für das Nichtergrünen der bei niedrigen Temperaturen gewachsenen Pflanzen könnte somit in der verminderten Menge der Chlorophyll-Synthetase in diesen Pflanzen liegen. Eine weitere Ursache könnte auch in einem temperaturabhängigen Schritt im Chlorophyll-Biosyntheseweg vor Pchlid liegen. Keckeis (1983) konnte nämlich zeigen, daß nach der Be-

lichtung von etioliertem Hafer die Reakkumulation von Pchlid in der anschließenden Dunkelperiode unterbleibt, wenn die Pflanzen dabei auf 4° C gekühlt werden. Der Befund, daß in den untersuchten etiolierten Alpenpflanzen *Taraxacum alpinum*, *Eriophorum angustifolium* und *Luzula lutea* kein Pchlid gefunden wurde, könnte ein Hinweis in diese Richtung sein. Das Nichtergrünen der bei niedriger Temperatur wachsenden Pflanzen könnte somit unter Umständen damit erklärt werden, daß aufgrund der Temperaturabhängigkeit eines (mehrerer) Schritte(s) vor Pchlid nur wenig Pchlid gebildet wird und dieses zwar temperaturunabhängig in Chlid umgewandelt wird, welches dann jedoch aufgrund der temperaturabhängigen Veresterungsreaktion nur langsam in Chlorophyll umgewandelt wird. Die Veresterungsreaktion von Chlid und GGPP muß in diesen Pflanzen außerdem besonders langsam sein, da die Chlorophyll-Synthetase nur in geringer Menge vorliegt.

Das Etiolement der bei erhöhter Temperatur angezogenen Pflanzen beruht dagegen mit Sicherheit nicht auf einer verminderten Menge an Chlorophyll-Synthetase, da diese in vergleichbaren Mengen wie bei Normaltemperatur vorliegt, sondern höchstwahrscheinlich auf dem Fehlen von Thylakoidproteinen.

Der Nachweis der Chlorophyll-Synthetase in den grünen Pflanzen bestätigt die Versuche von Block et al. (1980), Soll & Schultz (1981) und Soll et al. (1983), die ebenfalls Chlorophyll-Synthetaseaktivität in grünen Geweben beschreiben. Darin zeigt sich neben der Temperaturabhängigkeit offensichtlich ein weiterer Unterschied zur Prothylidreduktase, deren Aktivität und Enzymmenge bei Belichtung in vivo sehr schnell abnehmen (Santel & Apel 1981, Mapleston & Griffiths 1980), sodaß für grüne Pflanzen ein anderes Enzymsystem diskutiert wird (Santel & Apel 1981). Genauere Aussagen über das Verhalten und Vorkommen der Chlorophyll-Synthetase erscheinen jedoch erst möglich, wenn eine genaue Identifizierung des Enzymproteins möglich ist.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Solubilisierung der Chlorophyll-Synthetase in aktiver Form ist mit LDAO, Triton X100, Brij 30, 56, 58, Sulfobetaine SB 12 und SB 14 sowie n-Octyl-Glucosid nicht möglich, mit Digitonin und CHAPS bedingt möglich. Erfolgreich konnte sie mit Brij W1 durchgeführt werden. Die Konzentration betrug dabei 0,1 %. Höhere Konzentrationen führten bereits zu einer Inaktivierung.
2. Das solubilisierter Enzym konnte durch Zugabe von 10 % Glycerin stabilisiert werden, nicht jedoch durch Zugabe von Substraten oder Lipid.
3. Das solubilisierter Enzym zeigt im pH-Bereich von 7 - 9 maximale Aktivität. Ein ausgeprägtes Aktivitätsmaximum innerhalb dieses Bereiches liegt nicht vor.
4. Als Substrat bevorzugt das aus Haferetioplasten solubilisierter Enzym GGFP gegenüber PPP. (Präferenz = 4:3). Für FPP und IPP konnte keine Veresterung festgestellt werden.
5. Konzentrierte Puffer (Tricin, Citrat, KPP, Pyrophosphat, 500 mM - 1 M) lassen die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase innerhalb kurzer Zeit auf ein Minimum sinken. Auch durch Salze wie KCl, NaCl, LiCl wird das Enzym irreversibel inaktiviert.
6. Bei der Glyceringradientenzentrifugation konnte ein Auftreten der Chlorophyll-Synthetaseaktivität im Gradienten bei ca. 20 % Glycerin nachgewiesen werden.
7. Die Chlorophyll-Synthetase bindet bei pH-Werten über 6,5 nicht an den Kationenaustauscher CM-Cellulose, d.h. es dürfte sich um ein saures Protein handeln.
8. Die Chromatographie über Anionenaustausch kann aufgrund der Salzempfindlichkeit des Enzyms auch bei Anwendung von Schutzsubstanzen nicht erfolgreich zur

Anreicherung der Chlorophyll-Synthetase herangezogen werden.

9. Die Molekularsiebchromatographie führte zu keiner Proteinaufreinigung. Dies dürfte auf die Micellengröße des verwendeten Detergenzes Brij W1 zurückzuführen sein.

10. Eine Proteinauftrennung konnte durch die Hydroxylapatitchromatographie erreicht werden. Die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase wurde dabei mit niedermolarem Kaliumphosphat-Puffer (30-70mM, pH 7,8) erzielt, was wiederum auf ein saures Protein schließen läßt.

11. SDS-PAGE zeigte, daß PChlid-Reduktase und Chlorophyll-Synthetaseaktivität bei der Hydroxylapatitchromatographie in unterschiedlichen Fraktionen angereichert werden.

12. Bei der hydrophoben Chromatographie mit Octyl-Sepharose bindet das Protein so stark, daß eine Elution unter nicht denaturierenden Bedingungen nicht möglich ist.

13. Im Plastiden-Envelope aus Erbsen konnte bei exogener Zugabe der Substrate keine Chlorophyll-Synthetaseaktivität nachgewiesen werden, d.h., eine Lokalisation des Enzyms im Envelope ist auszuschließen.

14. Sowohl bei Hafer als auch bei Roggen zeigten die Primärblattspitzen maximale Chlorophyll-Synthetaseaktivität. In plastidenribosomenfreien Keimlingsabschnitten von Roggen und Hafer, die bei 32° angezogen wurden, konnte die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase in vollem Maße nachgewiesen werden, was auf ein kernkodierte und cytoplasmatisch synthetisierte Enzym schließen läßt.

15. In Hochgebirgspflanzen, die bei niedrigen Temperaturen wachsen, zeigt die Chlorophyll-Synthetase dagegen verminderte Aktivität. Die für Hafer bereits festgestellte Temperaturabhängigkeit der

Veresterungsreaktion von Chlorophyllid und Geranylgeraniolpyrophosphat konnte in in vitro Versuchen mit verschiedenen Ergrünungsstadien von *Taraxacum alpinum*, *Eriophorum angustifolium* und *Luzula lutea* bestätigt werden. Die Aktivität der Chlorophyll-Synthetase nimmt mit sinkender Temperatur ab.

LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMSON, H.Y., G.R. HILLER, M. VESK, 1980: Chloroplast Development and the Synthesis of Chlorophyll a and b and Chlorophyll Protein Complexes I and II in the Dark. *Planta* 150, 269 - 274.
- ADAMSON, H.Y., N. PACKER, J. GREGORY, 1985 a: Chloroplast development and the synthesis of chlorophyll and protochlorophyllide in *Zostera* transferred to darkness. *Planta* 165, 469-476.
- ADAMSON, H.Y., W.T. GRIFFITHS, N. PACKER, M. SUTHERLAND, 1985 b: Light-independent accumulation of chlorophyll a and b and protochlorophyllide in green barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant* 64: 345 - 352.
- AKHTAR, M., A. AJAZ, D.L. CORINA, 1984: The mechanism of the attachment of esterifying alcohol in bacteriochlorophyll a biosynthesis. *Biochem. J.* 224, 187-194.
- APEL, K., H.J. SANTEL, T.E. REDLINGER, H. FALK, 1980: The Protochlorophyllide Holochrome of Barly (*Hordeum vulgare* L.). Isolation and Characterization of the NADPH-Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.* 111, 251 - 258.
- APEL, K., 1981: The Protochlorophyllide Holochrome of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Phytochrome-Induced Decrease of Translatable mRNA Coding for the NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.* 120, 89 - 93
- APEL, K., M. MOTZKUS, K. DEHESH, 1984: The biosynthesis of chlorophyll in greening barley (*Hordeum vulgare*). Is there a light-independent protochlorophyllide reductase? *Planta*, 161, 550-554, 1984.
- ARGYROUDI-AKOYUNOGLU, J., H. THOMOU, 1981: Separation of thylakoid Pigment-Protein Complexes by SDS-Sucrose Density Gradient Centrifugation. *FEBS*, Vol. 135, 1 177-181
- ARGYROUDI-AKOYUNOGLU J., 1984: The 77 k Fluorescence Spectrum of the Photosystem I Pigment-Protein Complex CPI a.
- BACH, T.J., D.H. ROGERS, H. RUDNEY, 1986: Detergent-solubilization, purification and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from radish seedlings. *Eur. J. Biochem.* 154, 103 - 111.
- BEER, N.S., W.T. GRIFFITHS, 1981: Purification of the enzyme NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase. *Biochem. Journal* 195, 83 - 92.
- BEISENHERZ, W.W., HJ.A.W. SCHNEIDER, 1974: Syntheseort von Enzymen der Chlorophyllbiosynthese. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 87, 161-166.

BENZ, J., 1980 a: Untersuchungen zur Chlorophyll-Biosynthese in etiolierten Haferkeimlingen: Veresterung von Chlorophyllid in vitro. Dissertation LMU München

BENZ, J., Ch. WOLF, W. RÜDIGER, 1980 b: Chlorophyll Biosynthesis: Hydrogenation of Geranylgeraniol. Plant Science Letters 19, 225 - 230

BENZ, J., W. RÜDIGER, 1981: Chlorophyll Biosynthesis: Various Chlorophyllides as Exogenous Substrates for Chlorophyll Synthetase. Z. Naturforsch. 36 c, 51 - 57, 1981.

BERNARDI, G., 1973: Chromatography of Proteins on Hydroxyapatite, Meth. Enzymology XXVII, 471.

BLOCK, M.A., J. JOYARD, R. DOUCE, 1980: Site of synthesis of geranylgeraniol derivatives in instant spinach chloroplasts. Biochim. biophys. Acta, 631, 210 - 219.

BÖGER, P., 1965: Chlorophyllase of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. Phytochem. 4, 435 - 443.

CAMM, E. L., B.R. GREEN, 1980: Fractionation of Thylakoid Membranes with the Nonionic Detergent Octyl- β -D-glucopyranoside. Resolution of Chlorophyll-Protein Complex II into two Chlorophyll-Protein Complexes. Plant Physiol. 66, 428 - 432.

CHIBA, Y., I. AIGA, M. IDEMORI, Y. SATOH, K. MATSUSHITA, T. SASA, 1967: Studies on Chlorophyllase of *Chlorella protothecoides*. I. Enzymatic phytylation of methyl chlorophyllide. Plant Cell Physiol. 8, 623 - 635.

CLINE, K., J. ANDREWS, B. MERSEY, E.H. NEWCOMB, K. KEEGSTRA, 1981: Separation and characterization of inner and outer envelope membranes of pea chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3595 - 3599.

DEHESH, K., I. HAUSER, K. APEL, K. KLOPFSTECH, 1983: The distribution of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in relation to chlorophyll accumulation along the barley leaf gradient. Planta 158: 134 - 139.

DEHESH, K., M. RYBERG, 1985: The NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase is the major protein constituent of prolamellar bodies in wheat (*Triticum aestivum*, L.). Planta, 164: 396-399.

DOGBO, O., B. CAMARA, R. MONEGER, 1982: Chlorophyll Synthetase in Chloroplasts and Chromoplasts isolated from pepper (*Capsicum annuum*) fruits. Comptes Rendues des Seances de l'Academie des Sciences, III. Sciences de la vie 295 (7), 477.

ELLIS, R.J., 1981: Chloroplast Proteins: Synthesis, Transport and Assembly, in: Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 111 - 37.

ELLSWORTH, R.K., 1971: Studies on Chlorophyllase. I. Hydrolytic and Esterification Activities of

Chlorophyllase from Wheat Seedlings. *Photosynthetica* 5 (3), 226 - 232.

FEIERABEND, J., U. SCHRADER-REICHHARDT, 1976: Biochemical Differentiation of Plastids and Other Organelles in Rye Leaves with a High-Temperature-induced Deficiency of Plastid Ribosomes. *Planta* 129, 133 - 145.

FEIERABEND, J., 1977: Capacity for Chlorophyll Synthesis in Heat-Bleached 70 S Ribosome - deficient Rye Leaves, *Planta* 135, 83 - 88.

FEIERABEND, J., M. MIKUS; 1977: Occurrence of a High Temperature Sensitivity of Chloroplast Ribosome Formation in Several Higher Plants. *Plant. Physiol.* 59, 863 - 867.

FEIERABEND, J., 1979: Role of Cytoplasmatic Protein Synthesis and its Coordination with the Plastidic Protein Synthesis in the Biogenesis of Chloroplasts. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 92, 553 - 574.

FEIERABEND, J., 1982: Inhibition of chloroplast ribosome formation by heat in higher plants. In Edelman et al. (eds.), *Methods in Chloroplast molecular biology*, 53, 671 - 680. Elsevier Biochemical Press.

FRENCH, C.S. 1960: The chlorophylls in vivo and in vitro. In W. Ruhland (Ed.), *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. 5/1, 252 - 297.

GONENNE, A., E. ROBERT, 1978: Solubilization of Membrane Proteins by Sulfobetaines, Novel Zwitterionic Surfactants. *Anal. Biochem.* 87, 28-38.

GORBUNOFF, M.J., 1983: The Interaction of Proteins with Hydroxyapatite. II. Role of Acidic and Basic Groups. *Analytical Biochemistry*, 136, 433-439.

GRANICK, S., 1950: Magnesium Vinyl Pheoporphyrin a_5 , another Intermediate in the Biological Synthesis of Chlorophyll. *J. Biol. Chem.* 183, 713.

GRIFFITHS, W.T., 1978: Reconstitution of Chlorophyllide Formation by Isolated Etioplast Membranes. *Biochem. J.* 174, 681 - 92.

GRIFFITHS, W.T., N.S. BEER, 1982: Site of Synthesis of NADPH, *Plant Physiol.* 70, 1014 - 1018.

GRIFFITHS, T.W. R.P. OLIVER, 1984: Protochlorophyllide reductase - structure, function and regulation. In *Chloroplast biogenesis*, R.J. Ellis (ed.), Cambridge University Press, 245 - 258.

GRIFFITHS, T.W., ST.A. KAY, R.P. OLIVER, 1985: The presence and photoregulation of protochlorophyllide reductase in green tissues. *Plant Molecular Biology* 4: 13 - 22.

GRONAU, G., 1983: Untersuchungen zur Chlorophyll-Biosynthese in etiolierten Haferkeimlingen: In vitro

Chlorophyll-Synthetase Test, Kinetik und Aufreinigung der Chlorophyll-Synthetase. Dissertation LMU München.

HAUSER, I., K. DEHESH, K. APEL, 1984: The proteolytic Degradation in vitro of the NADPH-Protochlorophyllide Oxidoreductase of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Arch. of Biochem and Biophys. 228, 2, 577-586.

HARFSTER, M., K. APEL, 1985: The light-dependent regulation of gene expression during plastid development in higher plants. Physiol. Plant. 64: 147-152.

HELENIUS, A., K. SIMONS, 1975: Solubilization of Membranes by Detergents. BBA, 415, 29 - 79.

HELENIUS, A., D.R. MCCASEIN, E. FRIES, C. TANFORD, 1979: Properties of Detergents. Meths. Enzym. 56, 734 - 749.

HJELMELAND, L.M., D. W. NEBERT, A. CHRAMBACH, 1979: Electrofocusing of integral Membrane Proteins in Mixtures of Zwitterionic and Nonionic Detergents. Anal. Biochemistry 95, 201-208.

HJELMELAND, L.M., 1980: A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: Design and Synthesis, Proc. Nat. Acad. Scie., USA 77, 6368-6370.

HJELMELAND, L.M., D.W. NEBERT, J.C. OSBORNE Jr., 1983: Sulfobetaine Derivatives of Bile Acids: Nondenaturing Surfactants for Membrane Biochemistry. Anal. Biochem. 130, 72 - 82.

HLADIK J., D. SOFROVA, 1980: Chlorophyll-Protein Complexes of Spinach Chloroplasts Prepared by Triton X 100 Treatment. Photosynthetica 14 (4): 532 - 544.

HOLDEN, M., 1961: The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase. Biochem. J. 78, 359 - 364.

IKEUCHI, M., MURAKAMI, S. 1983: Separation and characterization of prolamellar bodies and prothylakoids from squash etioplasts. Plant Cell Physiol. 24, 71 - 80.

IL'INA, E.A. KOTOVA; A.Yu. BORISOV, 1981: The Detergent and Salt Effect on the Light-Harvesting Chlorophyll a/b Complex from Green Plants. BBA, 636, 193 - 200.

KANNANGARA, C.G., S.P. GOUGH, B. HANSEN, J.N. RASMUSSEN, D.J. SIMPSON, 1977: A homogenizer with replaceable razor blades for bulk isolation of active barley plastids. Carlsberg Res. Comm. 42, 432 - 439.

KAHN, A., N. AVIVI-BLEISER, D. VON WETTSTEIN: Genetic Regulation of chlorophyll synthesis analysed with double mutants in barley. In: Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria. Böcher, Th. W. Neupert, W. Sebald, S. Werner, eds. 119-31, Amsterdam: North-Holland 1976.

KAY, S.A., W.T. GRIFFITHS, 1983: Light-Induced Breakdown of NADPH - Protochlorophyllide Oxidoreductase in vitro.

Plant Physiol. 72, 229-236.

KECKEIS, F.J., 1983: Die letzten Schritte der Chlorophyll-Biosynthese im etiolierten Haferkeimling, in Abhängigkeit seines morphologischen Alters. Diplomarbeit LMU München.

KESSELMEIER, J., 1982: Steroidal saponins in etiolated greening and green leaves and in isolated etioplasts and chloroplasts of *Avena sativa*. Protoplasma 112, 127- 132.

KIRK, J.T.O., 1968: Studies on the Dependence of Chlorophyll Synthesis on Protein Synthesis in *Euglena gracilis*, together with a Nomogram for Determination of Chlorophyll Concentration. Planta 78, 200 - 207.

KIRK, J.T.O., R.A.E. TILNEY-BASSETT, 1978: The inheritance and genetic behaviour of plastids. In J.T.O. Kirk and R.A.E. Tilney-Bassett (Ed.), The Plastids, pp 251 - 521). Elsevier / North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.

KLEIN, A.O., W. VISHNIAC, 1961: Activity and Partial Purification of Chlorophyllase in Aqueous Systems. J. Biol. Chem. 236, 2544-2547.

KLINGENBERG, M., H. AQUILA, P. RICCIO, 1980: Isolation of Functional Membrane Proteins Related to or Identical with the ADP, ATP - Carrier of Mitochondria, Methods in Enzymology, 56, 407 - 414.

KREUZ, K., H. KLEINIG, 1981: Chlorophyll Synthetase in Chlorophyll-free Chromoplasts, Plant Cell Reports, 40 - 42.

LAEMMLI, U.K., 1970: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680 - 685.

LAYNE, E., 1957: Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins, in Methods in Enzymology, Vol. 3 (S. P. Colowick and N.O. Kaplan, Eds.), Academic Press, New York, 1957, p. 447.

LEONG, T.Y., J.M. ANDERSON, 1984: Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll-protein complexes. Photosynthesis Research, 5, 105 - 115.

LISCIA, D.S., T. ALHADI, B.K. VONDERHAAR, 1982: Solubilization of Active Prolactin Receptors by a Nondenaturing Zwitterionic Detergent. J. Biol. Chem. 257/16, 9401-9405.

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL, 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.

LÜTZ, C., U. NORDMANN, 1983: The localization of saponins in prolamellar bodies mainly depends on the isolation of etioplasts. Z. Pflanzenphysiol. 110, 201 - 210.

MAIN, R.K., M.J.WILKINS, L.J. COLE, 1959: A Modified Calcium Phosphate for Column Chromatography of Polynucleotides and Proteins. *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 6490.

MAPLESTON, R.E., W.T. GRIFFITHS, 1980: Light modulation of the activity of protochlorophyllide reductase. *Biochem J.* 189, 125 - 133).

MATUD, Y., S.I. MATSUI, N. NISHI, F. WADA, A. SANDBERG, 1985: Quantitative Solubilization of Nonhistone Chromosomal Proteins without Denaturation Using Zwitterionic Detergents. *Anal. Biochem.* 150, 337 - 344.

MICHEL, H., 1984: Embo-Practical Course on Purification and Christallization of Membrane Proteins, 19-29 März 1984, Martinsried.

MOURIOUX, G., R. DOUCE, 1981: Slow passive diffusion of orthophosphate between intact isolated chloroplasts and suspending medium. *Plant Physiol.* 67, 470 - 473.

NAKATANI, H.Y., J. Barber, 1977: An improved method for isolating chloroplasts retaining their outer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 461, 510 - 512.

OLIVER, R.P., W.T. GRIFFITHS, 1982: Pigment-Protein-Complexes of Illuminated Etiolated Leaves. *Plant Physiol.* 70, 1019 - 1025

PFEIFFER, F., D. GRAHAM, H. BETZ, 1982: Purification by Affinity Chromatography of the Glycine Receptor of Rat Spinal Cord. *J. Biol. Chem.* 257/16, 9389 - 9393.

PFISTERER, J., P. LACHMAN, K. KLOPPSTICH, 1982: Transport of proteins into chloroplasts. Binding of nuclear-coded chloroplast proteins to the chloroplast envelope. *Eur. J. Biochem.* 126: 143 - 148.

RADEMACHER, E., J. FEIERABEND, 1976: Formation of Chloroplast Pigments and Sterols in Rye Leaves Deficient in Plastid Ribosomes, *Planta* 129, 147- 153.

RÖPER, U., P. BERGWELER, C. LÜTZ, 1983: The occurrence of the protochlorophyllide reductase from oat etioplasts as a single 37 kD polypeptide. *Z. Pflanzenphysiol.* 112, 89 - 93.

RUDOI, A.B., A.Y.VEZITSKII, A.A. SHLYK, 1982: Study of the Enzyme System converting Chlide to Chl in Etiolated Leaves using exogenous Substrates. Plenum Publishing Corporation, Translated from *Biokhimiya* 47, 5, 733-739.

RÜDIGER, W., P. HEDDEN; H.-P. KÖST, D.J. CHAPMAN, 1977: Esterification of Chlorophyllide by GGPP in a cell-free System from Maize Shoots. *Biochem. and Biophys. Research Comm.* 74, 3.

RÜDIGER W., J. BENZ, Ch. GUTHOFF, 1980: Detection and Partial Characterization of Activity of Chlorophyll Synthetase in Etioplast Membranes. *Eur. J. Biochem.* 109, 193 - 200.

RÜDIGER, W. J. BENZ, 1984: Synthesis of chloroplast pigments. R.J. Ellis (ed.), Chloroplast Biogenesis, Cambridge University Press, 1984, 225 - 244.

SANDERMANN H., Jr., 1983: Lipid solvation and kinetic cooperativity of functional membrane proteins. Trends in Biochem. Sci. 8, 408.

SANTEL, H.J., K. APEL, 1981: The Protochlorophyllide Holochrome of Barley (*Hordeum vulgare* L.) The Effect of Light on the NADPH-Protochlorophyllide Oxidoreductase. Eur. J. Biochem. 120, 95 - 108.

SCHOCH, S., U. LEMPERT, W. RÜDIGER, 1977: Über die letzten Stufen der Chlorophyll-Biosynthese; Zwischenprodukte zwischen Chlorophyllid und phytolhaltigem Chlorophyll, Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 83/5, 427 - 436.

SCHOCH, S., 1978: The Esterification of Chlorophyllide a in Greening Bean Leaves. Z. Naturforsch. 33 c, 712 - 714.

SCHNEIDER, H.A.W., 1975: Chlorophylle: Aspekte der Biosynthese und ihrer Regulation. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 88, 83 - 123.

SCHNEIDER, H.A.W., 1976: Enzymic capacities for chlorophyll biosynthesis. Activation and de novo synthesis of enzymes. Z. Naturforsch. 31 c, 55 - 63.

SCHOPFER, P., H.W. SIEGELMAN, 1968: Purification of protochlorophyllide holochrome. Plant Physiol. 43, 990 - 996.

SHIMIZU, S., E. TAMAKI, 1963: Chlorophyllase of Tobacco Plants. II. Enzymic phytylation of chlorophyllide and pheophorbide in vitro. Arch. Biochem. Biophys. 102, 152 - 158.

SIEGELMAN, H.W., G.A. WIECZOREK, B.C. TURNER, 1965. Preparation of Calcium Phosphate for Protein Chromatography. Anal. Biochem., 13, 402.

SIMONDS, W.F., G. KOSKI, R.A. STREATY, L.M. HJELMELAND, W.A. KLEE, 1980: Solubilization of active opiate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 77, 4623-4627.

SOLL, J., G. SCHULTZ, 1981): Phytol synthesis from geranylgeraniol in spinach chloroplasts. Biochem. biophys. Res. Commun. 99, 907 - 912.

SOLL, J. G. SCHULTZ, W. RÜDIGER, J. BENZ, 1983. Hydrogenation of Geranylgeraniol. Plant Physiol. 71, 849 - 854.

SONE, N., M. YOSHIDA, HAJIME H., Y. KAGAWA, 1975: Purification and Properties of a Dicyclohexyl-carbodiimide-sensitive Adenosine Triphosphatase from a Thermophilic Bacterium. J. Biol. Chem. 250, 7917 - 7923.

SPENCER, M., M. Grynepas, 1978: Hydroxyapatite for

Chromatography. I. Physical and Chemical Properties of Different Preparations. J. Chromat. 166, 423.

SPENCER, M., 1978: Hydroxyapatite for Chromatography. II. Sources of Variability and Improved Methods of Preparation. J. Chromat. 166, 435.

STEIGER, A., U. MITZKA-SCHNABEL, W. RAU, J. SOLL, W. RÜDIGER, 1985: Inhibition of GGPP-Synthesis in in-vitro Systems. Phytochemistry 24, 4, 739 - 743.

TANFORD, CH., J.A. REYNOLDS, 1976: Characterization of Membrane Proteins in Detergent Solutions. BBA, 457, 133-170.

THÜMMLER F., 1984: Der Phytochrom-Chromophor: Chemie der Photokonversion von Phytochrom. Dissertation LMU München.

TISELIUS, A., S. HJERTEN, O. LEVIN, 1956: Protein Chromatography on Calcium Phosphate Columns. Arch. Biochem. Biophys. 65, 132.

WELLBURN, A. R., 1970: Studies on the esterification of chlorophyllides. Phytochem. 9, 2311 - 2313.

WELLBURN, A.R., 1976: Evidence for chlorophyll esterified with geranylgeraniol in newly greened leaves. Biochem. Physiol. Pflanz. 169, 265 - 271.

WILLSTATTER, R., A. STOLL, 1913: Untersuchungen über Chlorophyll. Springer Verlag Berlin.

WOLFF, J.B., L.PRICE, 1957: Terminal Steps of Chlorophyll a Biosynthesis in Higher Plants. Arch. Biochem. Biophys. 72, 293-301.

L e b e n s l a u f

20.3.1954:	geboren in Ingolstadt
1960 - 1966	Volksschule in Ingolstadt-Etting
1966 - 1970	Mädchenrealschule der Franziskanerinnen
1970 - 1972	Städt. Sprachenschule der Stadt München
1972 - 1974	Berufstätig als Sachbearbeiterin
1974 - 1977	Münchenkolleg der Stadt München
1977	Abiturprüfung
WS 1977/78	Studium der Biologie an der
- SS 1983	Ludwig-Maximilians-Universität in München
	Diplomvorprüfung: 1980
	Diplomhauptprüfung: 1982
	Diplomarbeit: Juni 1982 - April 1983
Mai 1983	Beginn der Dissertation am Botanischen Institut der Universität München unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger

